



universität
wien

DIPLOMARBEIT

Titel der Diplomarbeit

16S rRNA Stable Isotope probing von psychrophilen
sulfatreduzierenden Mikroorganismen in Inkubation von
arktischen marinen Sedimenten mit Azetat

Verfasserin

Martina Putz

angestrebter akademischer Grad

Magistra der Naturwissenschaften (Mag.rer.nat.)

Wien, 2012

Studienkennzahl lt. Studienblatt: A 0502520

Studienrichtung lt. Studienblatt: A444

Betreuer: Ass.-Prof.-Dr. Alexander Loy

Inhalt

1. Einleitung	4
1.1. Der Schwefel Kreislauf.....	4
1.2. Sufatreduzierende Mikroorganismen (SRM).....	6
1.3. Habitate	8
1.4. Marine Sedimente.....	8
1.5. Volatile Fettsäuren	9
1.6. Mikrobielle Diversität in Station J	9
1.7. Ziele dieser Arbeit	11
2. Material und Methoden	12
2.1. Probennahme.....	12
2.2. Standorte	12
2.3. Labormaterialien	13
2.4. Inkubation	16
2.5. Versuchsaufbau	16
2.6. Zeitlicher Ablauf	17
2.7. Sulfatreduktionsraten (SRR)	18
2.8. RNA Isolation	18
2.9. Isotopen Massenspektrometrie	19
2.10. Ultrazentrifugation	20
2.11. Reverse Transkriptions-PCR (1-step)	21
2.12. Reverse Transkription.....	22
2.13. Quantitative PCR	22
2.14. RNA Quantifizierung durch RiboGreen®	23
2.15. PCR.....	23
2.16. Gelelektrophorese.....	24
2.17. Agencourt RNA clean up system	24
2.18. Terminale Restriktionsfragment Längenpolymorphismus Analyse (T-RFLP)	24
3. Ergebnisse	26
3.1. <i>E.coli</i> Dichtegradientenzentrifugation.....	26
3.2. Methodische Optimierung	28
3.2.1. Reverse Transkriptions-PCR (1-step)	28
3.2.2. MgCl ₂ und Taq Polymerase Konzentrationen	29

3.2.3. PCR Zyklenzahl	30
3.3. Aktivitätsnachweis der Inkubationen durch Sulfatreduktionsraten	33
3.4. RNA Isolation	34
3.5. Anreicherung an ¹³ C-Atomen in RNA Proben.....	35
3.6. quantitative PCR	36
3.7. T-RFLP	40
4. Diskussion	45
4.1. Sulfatreduktionsraten	46
4.2. SIP	47
5. Zusammenfassung	51
6. Literatur	52
7. Abkürzungen	61
8. Anhang	63
9. Curriculum Vitae	66
10. Danksagung	67

1. Einleitung

1.1. Der Schwefel Kreislauf

Die Erde setzt sich aus einer Vielzahl an Elementen zusammen. Die am häufigsten vorkommenden Elemente sind Wasserstoff, Kohlenstoff, Stickstoff, Sauerstoff, Phosphor und Schwefel. Schwefel kann in neun verschiedenen Oxidationsstufen vorliegen: Sulfid (S^{II}), Cystin (S^I), elementarer Schwefel (S^0), Thioschwefelige Säure (S^{II+}), Thioschwefelsäure (S^{II+}), Dithionige Säure (S^{III+}), Sulfit (S^{IV+}), Tetrathionat (S^{V+}) und Sulfat (S^{VI+}). Am häufigsten tritt Schwefel in Form von Pyrit (FeS_2) oder Gips ($CaSO_4$) in Gesteinen und Sedimenten oder als Sulfat (SO_4^{2-}) im Meerwasser auf. Während Pyrit oder Gips biologisch schlecht verwertbar sind, spielen Sulfat und Schwefelwasserstoff (H_2S) eine große Rolle im Schwefelkreislauf. Weiters ist Schwefel ein essentielles Element lebender Zellen, wo er vor allem als Bestandteil der Aminosäure Cystein und Methionin in Proteinen vorkommt.

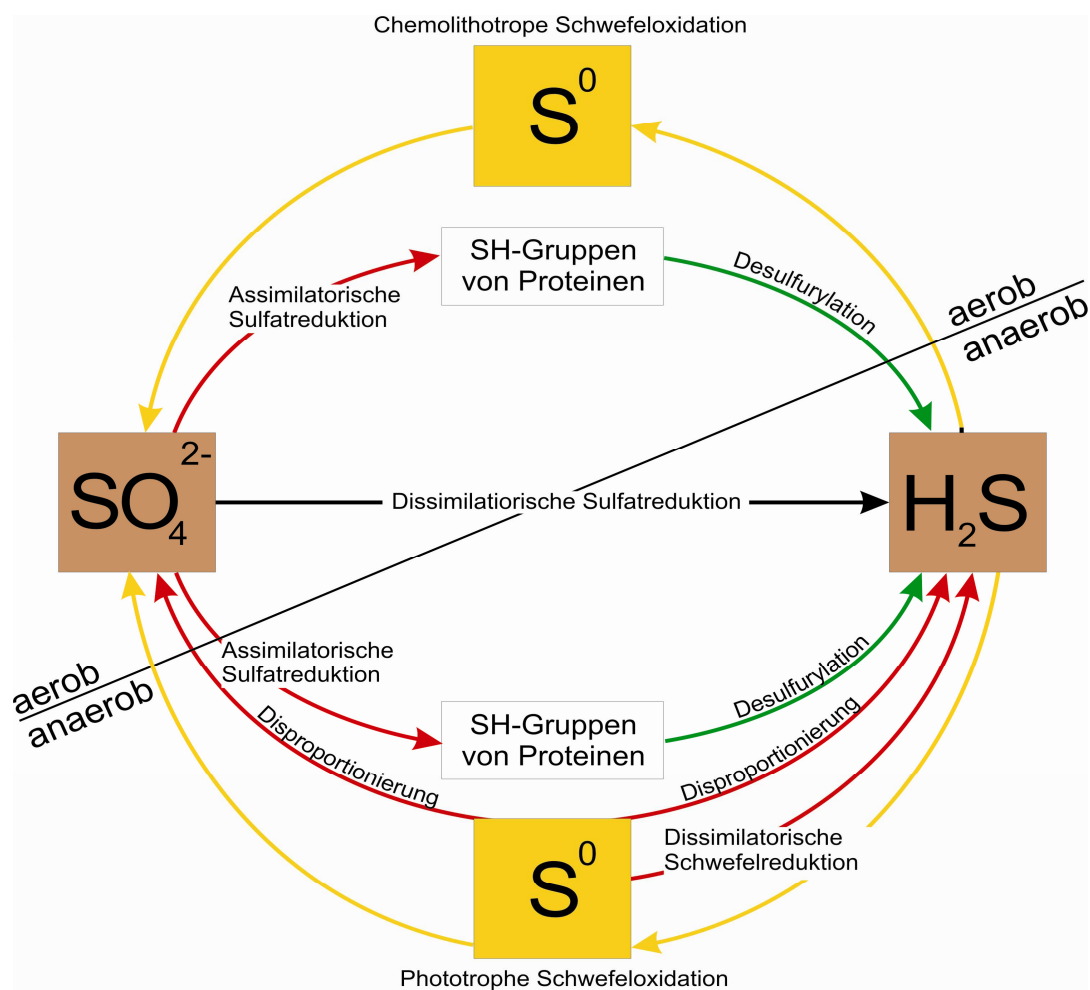


Abb.1: Schematische Darstellung des Schwefelkreislaufes. Oxidationsvorgänge werden durch gelbe, Reduktionen durch rote Pfeile dargestellt. Bei der Desulfurylation bleibt die Oxidationszahl des Schwefels unverändert. (aus Madigan *et al.* 2009)

Durch assimilatorische Sulfatreduktion können Pflanzen, Pilze und einige Mikroorganismen Schwefel in Form von Sulfat aufnehmen und über mehrere Schritte zu einem Bestandteil der Aminosäuren Cystein oder Methionin reduzieren, welche dann als Substrat zur Synthese von anderen organischen Schwefelverbindungen dient (siehe Abb.1). Durch den Prozess der Desulfurylation wird beim Abbau der Biomasse durch Mikroorganismen, der enthaltene Schwefel zu Sulfid reduziert. Durch die Sulfidoxidation wird Sulfid wieder zu Sulfat oxidiert. Über diese Fähigkeit verfügen zwei Gruppen von Mikroorganismen: einerseits anaerobe, phototrophe Bakterien und andererseits aerobe, chemolithotrophe Bakterien (Madigan *et al.* 2009).

Für viele Mikroorganismen sind Sulfat, Sulfid und Thiosulfid an Energiegewinnungsprozessen maßgeblich beteiligt. Diese Sulfatreduzierenden Mikroorganismen (SRM) assimilieren Schwefelverbindungen nicht zu Biomasse, sondern verwenden die dissimilatorische Sulfatreduktion zur Energiegewinnung (Krakhoff-Schweizer *et al.* 1995). Jener Vorgang findet nur in anoxischen bzw. mikrooxygenen Lebensräumen statt und stellt eine wichtige Komponente des Schwefel- sowie Kohlenstoffkreislaufes dar (Brune *et al.* 2000)

Aus chemischer Sicht ist Sulfat kein idealer Elektronenakzeptor für Mikroorganismen da das Redoxpotential E^0 des Redoxpaares Sulfat-Sulfid mit -516 mV zu negativ ist um vorhandene Elektronenträger wie NADH oder Ferredoxin zu reduzieren (Madigan *et al.* 2009). Daher muss das Sulfat vor der Reduktion durch das Enzym ATP-Sulfurylase mit Adenosin-Triphosphat (ATP) zu Adenosin-Phosphosulfat (APS) aktiviert werden. Ein weiteres Enzym, die APS-Reduktase katalysiert den Schritt, bei dem APS zu Sulfit reduziert wird (-60 mV). Dabei werden zwei Elektronen auf das Schwefelatom übertragen und Adenosin-5'-Monophosphat wird frei (AMP). Die dissimilatorische (Bi)Sulfitreduktase (*dsr*) überträgt sechs Elektronen auf das Schwefelatom des Sulfits. Diese Elektronenübertragung ist an die Elektronentransportkette einer Membran gekoppelt, was zur Bildung eines Protonengradienten führt, welcher für die Synthese von ATP genutzt wird (Madigan *et al.* 2009).

Badziong und Thauer (1978) zeigten, dass ein *Desulfovibrio* Stamm welcher Wasserstoff und Sulfat zur Verfügung hat, durch die Sulfatreduktion einen Energiegewinn von einem ATP Molekül pro reduziertes Sulfat verzeichnen kann. Abzüglich der Energiekosten, welche bei der Aufnahme und Aktivierung des Sulfats entstehen, bleibt ein Ertrag von einem Viertel ATP Molekül pro Sulfat Molekül (Thauer 2007).

1.2. Sulfatreduzierende Mikroorganismen (SRM)

Der Schwefelkreislauf ist eng an den Kohlenstoffkreislauf geknüpft (Muyzer & Stams, 2008). SRM teilt man in zwei funktionelle Gruppen, jene welche organisches Material zu Azetat abbauen (unvollständige Oxidierer) und jene welche organische Verbindungen, darunter Azetat vollständig zu Kohlenstoffdioxid oxidieren (siehe Abb.2). Für die Oxidation von Azetat verwenden SRM einen veränderten Zitronensäurezyklus wie *Desulfobacter postgatei* (Brandisheep *et al.* 1983) oder den Acetyl-CoA Weg wie *Desulfococcus* Arten (Schauder 1986) oder *Desulfobacca acetoxidans* (Oude *et al.* 1999). Unterschiedliche Arten von SRM verwenden verschiedene Substrate als Kohlenstoffquelle wie Kohlenstoffverbindungen mit nur einem C-Atom (Nanninga & Gottschal 1987; Tanimoto & Bak 1994; Parshina *et al.* 2005), lang- und kurzkettige Alkane (Aeckersberg *et al.* 1998; Kniemeyer *et al.* 2007), verschiedene Zucker (Sass *et al.* 2002) und Aminosäuren (Baena *et al.* 1998, Stams *et al.* 1985) (siehe Abb.2). SRM sind aber nicht in der Lage Polymere wie Zellulose, Proteine oder Nukleinsäuren zu verwerten und daher auf andere Organismen angewiesen, welche diese Stoffe hydrolysieren und fermentieren (Muyzer & Stams, 2008).

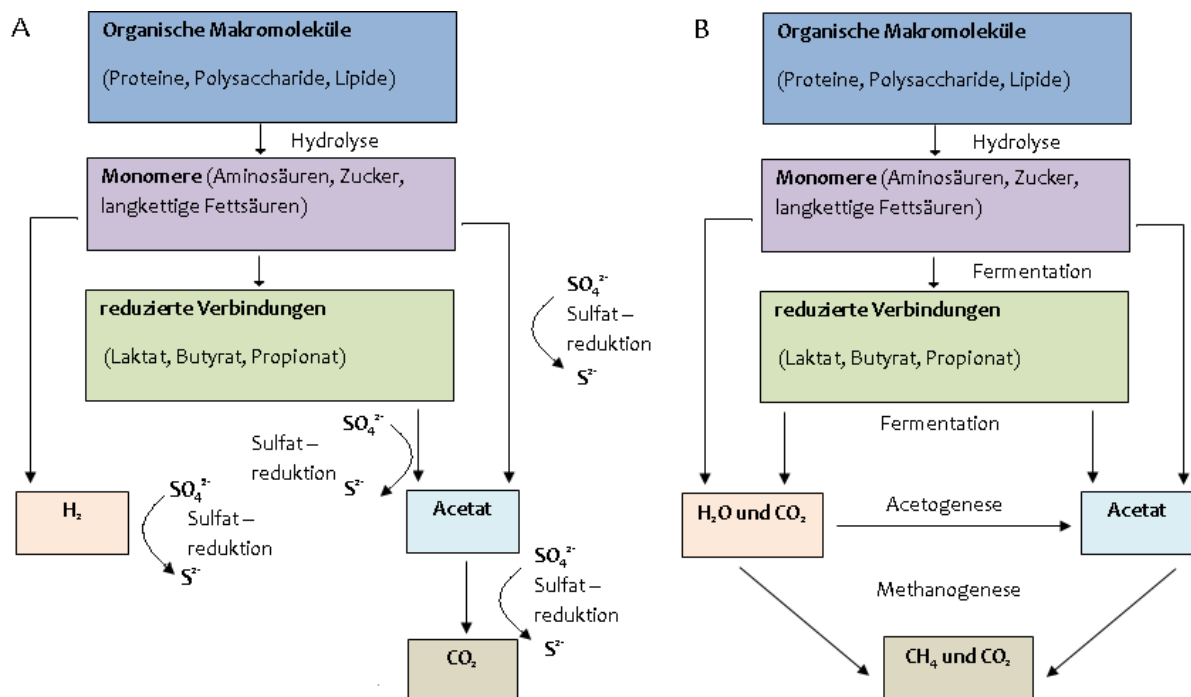


Abb.2: Darstellung des mikrobiellen Abbaus organischen Materials in anoxischer Umgebung. Makromoleküle werden von Bakterien hydrolysiert, die Monomere werden in eine Reihe von Fermentationsprodukten wie Azetat, Propionat, Butyrat, Laktat und Wasserstoff umgewandelt. Diese Produkte werden in Anwesenheit von Sulfat von SRM verwertet (A) oder produziertes Azetat wird ohne verfügbares Sulfat von Methanogenen konsumiert (B) (modifiziert von Muyzer & Stams, 2008).

Die physiologische Eigenschaft der Sulfatreduktion ist bei verschiedenen Bakterien sowie Archaea vorhanden. Anhand Untersuchungen der 16S rRNA als auch *dsrAB* Gene konnte man SRM in fünf bakterielle und zwei archaeale Phyla einteilen (siehe Abb.3) (Castro *et al.* 2000; Mori *et al.* 2003; Wagner *et al.* 2005). Die größte Gruppe der bekannten sulfatreduzierenden Bakterien machen Deltaproteobakterien (vor allem Arten der Familie *Desulfobacteraceae* und der Gattung *Desulfovibrio*) aus. Die zweitgrößte Gruppe unter den Bakterien ist die Gruppe der *Clostridia* und beinhaltend sulfatreduzierende Arten der Gattungen *Desulfosporosinus* und *Desulfotomaculum*. Diese Bakterien haben die Fähigkeit zur Endosporenbildung (Stackebrandt *et al.* 1997; Hattori *et al.* 2000; Sass *et al.* 2004). Andere bekannte bakterielle Linien sind thermophile Sulfatreduzierer wie *Nitrospirae*, *Thermodesulfobacteria*, *Thermodesulfobiaceae* und *Thermodesulfovibrio* (Jeanthon *et al.* 2002; Mori *et al.* 2003; Sekiguchi *et al.* 2008).

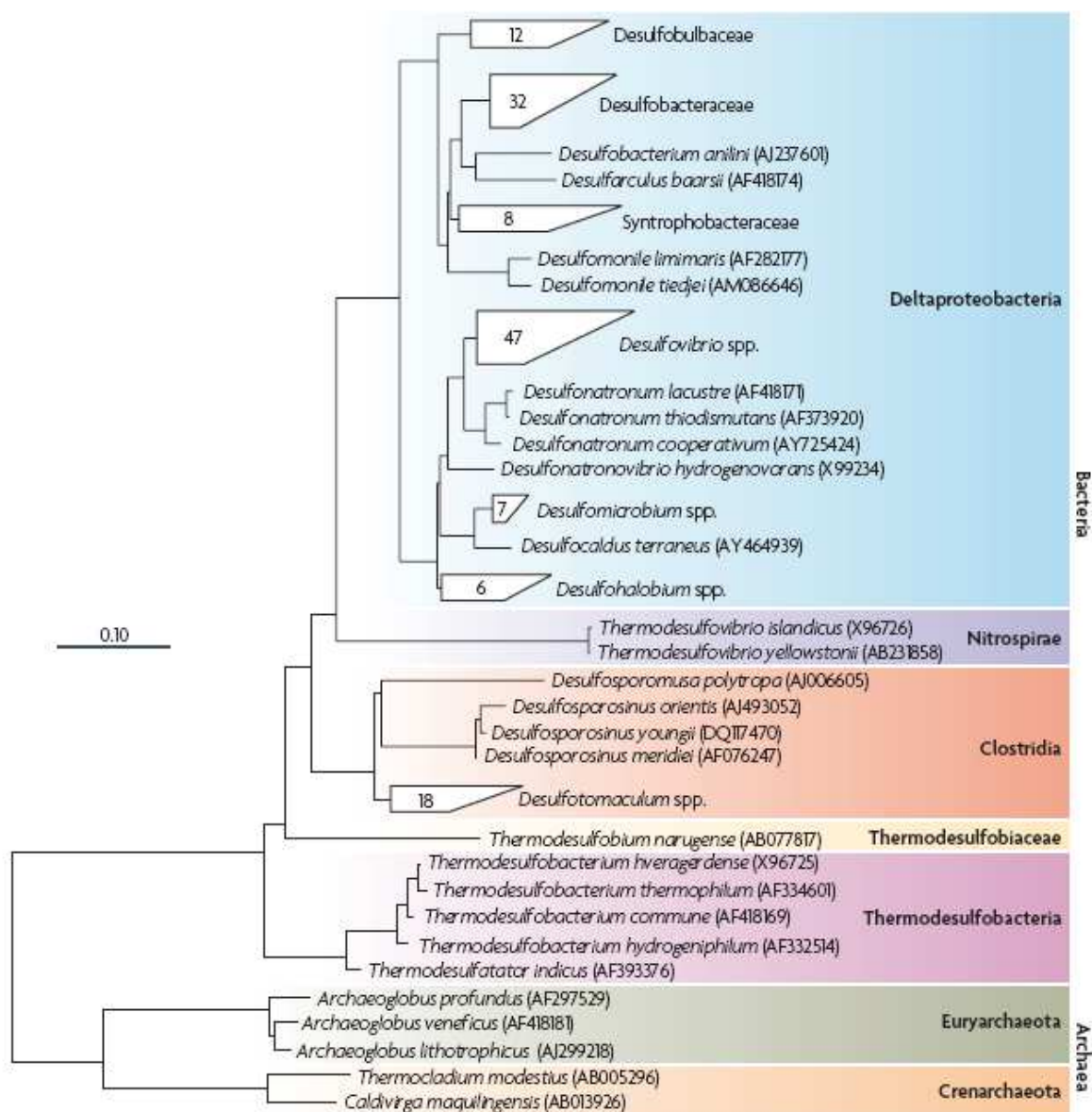


Abb.3: Phylogenetischer Baum berechnet auf Basis der 16S rRNA Sequenz beschreibender sulfatreduzierender Bakterien bestehend aus sieben Abstammungslinien, zwei der Archaea und fünf der Bakterien. Die Skala stellt 10% Unterschied dar. (Muyzer & Stams 2008)

1.3. Habitate

Viele SRM kommen an Extremstandorten von -2°C bis zu 100°C vor. SRM wurden in diversen aquatischen Systemen wie im Grundwasser oder Kläranlagen nachgewiesen (Ben-Dov *et al.* 2007; Manz *et al.* 1998; Schramm *et al.* 1999; Lehman 2001). Auch in anoxischen Sedimenten von Süßwasserseen, wo die Sulfatkonzentration zwischen 10-200 µM (Ingvorsen *et al.* 1981) liegt. Sie spielen eine wichtige Rolle in terrestrischen Ökosystemen wie Reisfeldern (Quattara *et al.* 1999; Scheid & Stubner 2001; Weber *et al.* 2001) oder Mooren (Alewell & Gieseemann 1996; Alewell & Novak 2001; Loy *et al.* 2004; Wentrup *et al.* 2007).

Da Erdöl-Derivate (Hansen 1994; Phelps *et al.* 1998; Kniemeyer *et al.* 2003) und Xenobiotika (Krumholz *et al.* 1999; Sung *et al.* 2003) von bestimmten SRM abgebaut werden können, gewinnen sie zunehmend an biotechnologischer Bedeutung und werden für Korrosionsschäden metallischer Oberflächen (Magot *et al.* 1997; Vileda *et al.* 2000) zum Beispiel an Öl- und Gaspipelines verantwortlich gemacht (Rao *et al.* 2000). In einer anderen Rolle für den Menschen wichtig sind potentielle Humanpathogene wie *Desulfovibrio spp.*, die an Parodontitis (Langendijk *et al.* 2001; Loubinoux *et al.* 2002), Leberabszessen (Schoenborn *et al.* 2001), Magen-Darm Entzündungen (Loubinoux *et al.* 2002) und Bakteriämie (McDougall *et al.* 1997; Loubinoux *et al.* 2000) beteiligt sein könnten.

1.4. Marine Sedimente

Aufgrund der hohen Sulfatkonzentration von rund 28 mM und der anoxischen Bedingungen sind marine Oberflächensedimente eines der wichtigsten Habitate von SRM. Die anaerobe Sulfatreduktion ist für über 50% der organischen Kohlenstoffmineralisation verantwortlich (Jørgensen 1982; Canfield *et al.* 1993; Nedwell *et al.* 1993). Der Abbau von komplexem organischem Material in aquatischen Systemen ist ein mehrstufiger Prozess welcher eine große Diversität an physiologisch spezialisierten Mikroorganismen benötigt (Blackburn 1987; Capone & Keine 1988). Vor allem in Küstengebieten, wo eine geschätzte Menge von 32-46% der Primärproduktion auf den Meeresgrund sinkt (Wollast, 1991) spielen SRM eine wichtige Rolle in der Remineralisation von Biomasse. Der sinkende Detritus wird von fermentativen Mikroorganismen remineralisiert und die anfallenden Stoffwechselprodukte dienen als Elektronendonatoren für Bakterien welche anorganisches Material als Elektronenakzeptor verwenden. Dabei sind die Reduktion von Eisen und Sulfat die bedeutendsten Reaktionen in den oberen Schichten der marinen Sedimente (Thamdrup, 2000).

Unter dem Aspekt, dass rund 90% der Meeressedimente eine Temperatur von 4°C und darunter aufweisen (Levitus & Boyer 2004), haben psychrophile Bakterien eine enorme Bedeutung. Wie Arnosti *et al.* (1998) zeigte, ist auch der Kohlenstoffumsatz beim Abbau organischer Substanzen in arktischer Umgebung nicht langsamer als in Sedimenten temperater Klimazonen. Auch Sulfatreduktionsraten und benthische Kohlenstoffmineralisation in arktischen Sedimenten sind ähnlich jener Sedimente in temperaten oder sogar tropischen Zonen (Glud *et al.* 1998; Sagemann *et al.* 1998). Die optimale Temperatur für Sulfatreduktion in arktischen Sedimenten ist signifikant höher als die in situ Temperatur. Dennoch ist die Differenz der Aktivität bei in situ Bedingungen und der für die Sulfatreduktion optimalen Temperatur kleiner als die Differenz in gemäßigten Klimazonen. Das kann als Beweis für die Anpassung der mikrobiellen Gemeinschaft an arktische Verhältnisse (Sagemann *et al.* 1998) gesehen werden.

1.5. Volatile Fettsäuren

Volatile Fettsäuren sind sehr häufige Endprodukte der Fermentation in Sedimenten und daher die wichtigsten organischen Substrate sulfatreduzierender Bakterien (Sørensen *et al.* 1981, Christensen 1984, Parkes *et al.* 1989). Bereits beschriebene SRM aus arktischen marinen Sedimenten wurden erfolgreich mit den Elektronendonatoren Formiat, Azetat, Propionate etc. bei -1,8 °C kultiviert (Knoblauch *et al.* 1999a und b). Finke *et al.* (2007) bestimmten die Oxidationsraten von volatilen Fettsäuren in Sedimentproben aus Svalbard. Dabei wurde die Sulfatreduktion inhibiert und die Akkumulation der Substrate beobachtet. Über einen Zeitraum von 28 Tagen wurde in der anoxischen Zone der Sedimente am meisten Acetat, gefolgt von Propionat und Isobutyrat gemessen. Daher ist Acetat in diesem Sediment der bedeutenste Elektronendonator. Die Ergebnisse zeigten große Differenzen der Proben aus den ersten beiden Zentimetern der Sedimente und der Schicht von 5-9 cm unter der Oberfläche. Sulfatreduktion ist für 76% in der oberen und 96% der unteren Schicht für die Produktion von gelöstem, organischen Kohlenstoff verantwortlich.

1.6. Mikrobielle Diversität in Station J

In der Vergangenheit wurden einige Studien über die Diversität der Sedimente von Station J durchgeführt (Teske *et al.* 2011, Knoblauch *et al.* 1999a, Ravenschlag *et al.* 1999, Ravenschlag *et al.* 2000). Obwohl die Proben aus der Sedimentschicht von 3-9 cm Tiefe aus Station J wesentlich weniger Zellen aufweisen (Ravenschlag *et al.* 2000), wird dennoch eine höhere Diversität festgestellt. Teske *et al.* stellten die mikrobielle Diversität der Wassersäule und den obersten 2 cm des Sediments sowie der unteren Schicht von 3-9 cm gegenüber. Rarefaction Kurven der Sedimentproben sind wesentlich steiler als jene der Wasserproben da ihnen eine deutlich größere Diversität zu Grunde liegt als jenen

der Wassersäule. Ein näherer Blick zeigt, dass die Zusammensetzung der Proben der oberen und der unteren Sedimentschicht sehr verschieden ist (Teske *et al.* 2011).

Die größte Gruppe darunter bilden mit 20% die Deltaproteobakterien (Teske *et al.* 2011). Entlang der gesamten Küste Svalbards ist die *Desulfosarcina-Desulfococcus* Gruppe sehr dominant und in Proben der Station J in einer Sedimentschicht von 5-10 cm beträgt der Anteil der mittels rRNA Slot Blot Hybridisierung nachgewiesenen Zellen rund 14,5% aller prokaryotischer RNA (Ravenschlag *et al.* 2000). Weitere häufig vorkommende Deltaproteobakterien sind *Desulfuromonas*, *Desulfotalea*, *Desulfobulbus*, *Desulfococcus*, *Desulfofrigus* und *Desulfofaba* welche alle zur anaeroben, chemoorganotrophen Familie der *Desulfobacteraceae* gehören (Ravenschlag *et al.* 2000). Auch Vertreter von *Desulfovibrio* und *Desulforhopalus* welche als anaerobe und unvollständige Oxidierer bekannt sind, wurden in arktischen, marinen Sedimenten nachgewiesen.

In den obersten Schichten des Sediments beträgt der Anteil der Alphaproteobakterien 4% (Teske *et al.* 2011). Weiters wurden rund 9% Gammaproteobakterien nachgewiesen sowie *Planktomycetes* und *Chloroflexi*, welche bekannte Bestandteile der mikrobiellen Gemeinschaft von Sedimenten sind (Inagaki *et al.* 2006).

Aus den Proben des Tiefenwassers sowie aus beiden Sedimentproben konnten Vertreter der *Verrucomicrobiae* nachgewiesen werden. *Verrucomicrobiae* wurden in vielfältigsten terrestrischen Habitaten, Böden und marinen Sedimenten entdeckt (Wagner & Horn 2006). Sequenzen aus Svalbard gehören zu zwei tief zweigenden Gruppen des Phylums in deren Gruppe unter anderem auch Endosymbionten eines Schwammes (*Rubritalea* spp.) einer marinen Algenart (*Luteolibacter algae*), und eines Endosymbionten eines Röhrenwurms (*Puniceicoccus*) (Teske *et al.* 2011).

Das in Böden, marinen Sedimenten und Ozeanen weit verbreitete, generell chemoorganotrophe Phylum der *Acidobacteria* (Quaiser *et al.* 2008) ist in oberflächennahen und tieferen Schichten der Sedimente vertreten.

Die nächsten Verwandten der entdeckten Planktomyceten sind Isolate aus heißen Schwefelquellen (Elshahed *et al.* 2007) und marinen Sedimenten (Durbin 2009). In den tieferen Schichten der Sedimente wurden bis zu 4% aller Zellen als Planktomyceten identifiziert (Ravenschlag *et al.* 2001).

Einige bakterielle Linien aus den Sedimenten von Station J werden von nur einem oder zwei Phylotypen repräsentiert. Zu diesen seltenen Phylotypen zählen die Betaproteobakteriellen Klone welche mit aeroben, methyloxidierenden Genus *Methylophilus* verwandt sind (Jenkins *et al.* 1987). Weitere Vertreter sind Klone aus dem Sediment (Rappe *et al.* 1997), Klone einer nitratreduzierenden Spezies (Miroshnichenko *et al.* 2003), marine autotrophe nitritoxidierende *Nitrospira marina* (Watson *et al.* 1986), Linien aus Gedärmen von Termiten (Ohkuma & Kudo; 1996), ein neues Phylum aus Wasserflöhen (Rodriguez *et al.* 2008), unkultivierte Vertreter der Spirochaeten (Dojka *et al.* 1998).

1.7. Ziele dieser Arbeit

Viele Studien befassten sich mit der Erforschung der physiologischen Eigenschaften und Diversität der mikrobiellen Gemeinschaft in arktischen Sedimenten. Dabei wurde die bakterielle Diversität (Teske *et al.* 2011, Ravenschlag *et al.* 1999), Sulfatreduktionsraten (Knoblauch *et al.* 1999a, Finke *et al.* 2007) das Vorkommen thermophiler Bakterien (Hubert *et al.* 2010), der Umsatz verschiedener Elektronendonoren wie Azetat, Lactate, Propionat und Isobutytrat (Finke *et al.* 2007), die Kohlenstoffremineralisation (Vandieken *et al.* 2006), Effekte von Temperaturunterschieden auf die Sulfatreduktions- und Wachstumsrate (Knoblauch & Jørgensen 1999) in arktischen marinen Sedimenten untersucht. Weiters wurden die ersten sulfatreduzierenden Bakterien aus Svalbard, welche bei 0°C kultiviert wurden, in Reinkultur gebracht (Knoblauch *et al.* 1999b).

In den letzten Jahren erstellten Diplomstudenten der Universität Wien *dsrAB* Genbanken von arktischen Sedimenten, um die Diversität der psychophilen SRM zu erforschen. Eine dominante Gruppe der Genbank der Sedimente aus Station J war eine tief zweigende Linie des *dsrAB* Stammbaumes (Barisic 2008). Entsprechende Sequenzen wurden auch an einem weiteren Standort Svalbards, in Station AH nachgewiesen (Lebherz-Eichinger 2009). Doch bis heute wurden keine Vertreter dieser unbekannten Gruppe an potentiellen Sulfatreduzierern identifiziert, obwohl ähnliche Sequenzen in einer Vielzahl verschiedener Habitate wie heiße Quellen (Dhillon *et al.* 2003), in sauren Moorböden (Loy *et al.* 2004, Schmalenberger *et al.* 2007) und in Uran kontaminiertem Grundwasser (Bagwell *et al.* 2006) entdeckt wurden.

So wurde im Rahmen dieser Diplomarbeit eine RNA-SIP Studie durchgeführt. Dabei wurden arktische marine Sedimente mit ^{13}C -Azetat inkubiert. Dadurch wird die RNA metabolisch aktiver Mikroorganismen (u.a. Sulfatreduzierer) über den Einbau von ^{13}C Isotopen markiert. In regelmäßigen Zeitabständen wurden der Inkubation Proben entnommen und RNA extrahiert um den Einbau von ^{13}C Atomen in die Nukleinsäuren verfolgen zu können. Über eine isopyknische Zentrifugation wurde extrahierte RNA ihrer Dichte nach aufgetrennt. Um die Existenz ^{13}C markierter RNA zu bestätigen wurde die RNA in den Fraktionen unterschiedlicher Dichte quantifiziert. Um Veränderungen der bakteriellen Gemeinschaft festzustellen wurde ein terminaler Restriktionslängenpolymorphismus (T-RFLP) angewandt.

2. Material und Methoden

2.1. Probennahme

Bei den Proben handelt es sich um Sedimente von Meeresböden, welche mittels eines HAPS Bodenbohrers entnommen wurden. Die oberen Schichten des erhaltenen Sedimentkerns wurden entfernt, da sich der Bereich der maximalen Sulfatreduktion bei 5-10 cm befindet (Finke *et al.* 2007). Die Schichten zwischen 5-10 cm wurden möglichst ohne Lufteinbringung in Plastiksäcke verpackt. Um starke Temperaturschwankungen zu vermeiden, wurden die Proben mit Eis auf 0°C gekühlt nach Österreich gebracht.

2.2. Standorte

Die Probenahme erfolgte im September 2010 an zwei Standorten in unterschiedlichen Fjorden der Inselgruppe Svalbard. Erster Standort war Station AH in Van Mijenfjorden (77° 45,75' Nord 15° 03,23' Ost). Eine Messung der Sedimenttemperatur von Station AH ergab -1,6 ° C in einer Wassertiefe von 116 m.

Als zweiter Standort wurde Station J (79° 44,27' Nord 11° 06,57' Ost) in Smeereburgfjorden, an der Nordwestküste der Insel Spitzbergen gewählt. Die Wassertiefe betrug 210-220 m. Die Temperatur des Sediments betrug zum Zeitpunkt der Probenentnahme 0,3° C.

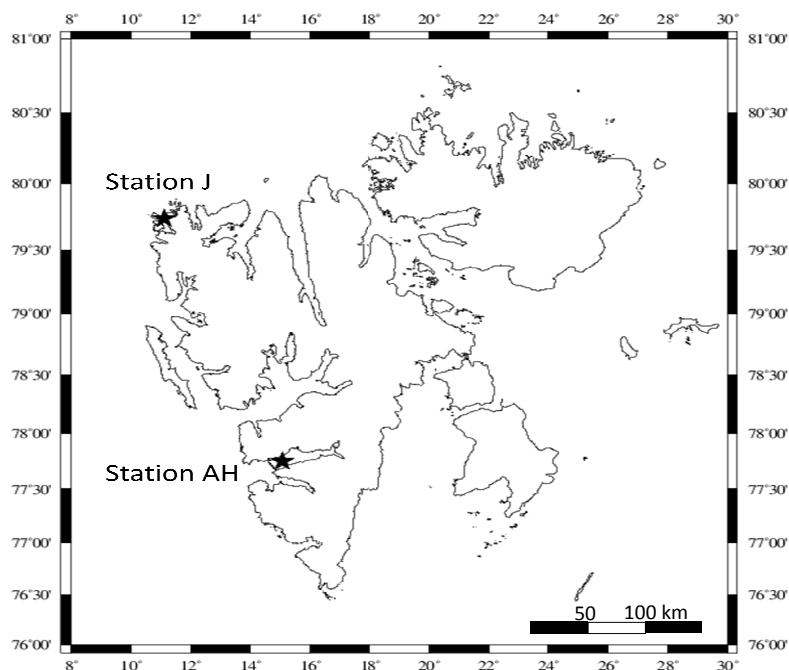


Abb.4: Übersicht der Inselgruppe Svalbard. Die Proben wurden an Station J und Station AH an der Westküste Svalbards entnommen. Karte erstellt mit GMT (Wessel *et al.* 1998)

2.3. Labormaterialien

Wasser welches zur Herstellung diverser Puffer und Lösungen für Versuche verwendet wurde, wurde zweifach entsalzt und gefiltert. Dieses Wasser (MQ_{bidest}) wurde stets einer Reinstwasseranlage (Biocel Milli-Q, Millipore corporation, Billerica, USA) entnommen.

Tab.1: Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsgegenstand	Hersteller
Bead beating tube	Beckman-Coulter Inc., Fullerton, CA, USA
Duran® Laborglasflaschen	Schott AG, Mainz, Deutschland
Eppendorf Reaktionsgefäße, versch. Größen	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Microtiterplatte	
Eppendorf® twin. tec PCR Platte 96	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
U96 MicroWell™ Platte, 0,5 ml	Nunc life science, Roskild, Dänemark
MF Millipore V Dialyse Filter 0.025 µm	Merck Millipore, Billerica, MA, USA
Nadeln:	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
Braun Sterican Z 20 G	
Braun Sterican Z 23 G	
Braun Sterican Z 26 G	
Optiseal™ Ultracentrifuge tubes 4.9ml	Beckman-Coulter Inc., Fullerton, CA, USA
Parafilm® "M"	Pechiney Plastic Packaging, Chicago, USA
Petrischale 94/16	Greiner Bio-one GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Pipettenspitzen, verschiedene Größen	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe, Deutschland
Schraubdeckel-Plastikgefäße, verschiedene Größen	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
96-Well schwarze Polystyrenplatte	Greiner-Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Filtertips, verschiedene Größen	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf, Deutschland

Tab.2: Liste der verwendeten technischen Geräte

Gerät	Hersteller
DNA Sequencer Applied Biosystems 3130	Applied Biosystems, Lincoln CA, USA
Digitales Refraktometer DR 301-95	A.Krüss Optronic GmbH, Hamburg, Deutschland
Fastprep 24 Beadbeater	MP Biomedicals, Denver, CO, USA
Gelelektrophorese-Apparatur Sub-Cell® GT	Biorad, München, Deutschland
Gelschlitten Sub-Cell®GT	Biorad, München, Deutschland
Infinite® 200 microplate reader	Tecan Group Ltd., Männedorf, Schweiz
Laminar flow hood Safe 2010 Model 1.2	Holten, Jouan Nordic, Allerød, Dänemark
Massenspektrometer EA-1110	Carlo Ebra, Mailand, Italien
Mikrowelle MD6460	Microstar
Milli-Q® Ultrapure Water Purification System	Millipore, Billerica MA, USA
NanoDrop® ND-1000 Spektrophotometer	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland
pH-Meter WTW inoLab Level 1	WTW GmbH, Weilheim, Deutschland
Pipetten, verschiedene Volumina	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland

PCR Thermocycler	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules CA, USA
Transilluminator UST-30M-8E (312nm)	Biostep GmbH, Jahnsdorf, Deutschland
Ultrazentrifuge Optima L-XP series	Beckman Coulter Inc., Fullerton, CA, USA
Ultrazentrifugen Rotor Vti 90	Beckman Coulter Inc., Fullerton CA, USA
UV Sterilizing PCR Workstation	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland
Pumpe WPI AL 2000	WPI Inc., Sarasota FL, USA
Thermocycler iCycler	Biorad, München, Deutschland
Vortex Genie 2	Scientific Industries, New York, USA
Waagen:	
Analytic Plus	Ohaus Corp., New York, USA
BL6100	Sartorius Stedim Biotech, Aubange, Frankreich
Wasserdampf Autoklav	H+P, München, Deutschland
Zentrifugen:	
Rotina 35	
Mikro 22R	Andreas Hettich GmbH & Co, KG, Tuttlingen, Deutschland
Mikro 120	
Zinnkapseln Feststoffe 5 x 9 mm	IVA Analysetechniken, Düsseldorf, Deutschland

Tab.3: Liste der verwendeten Chemikalien

Chemikalie	Hersteller
6x DNA Loading Dye	Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland
Cäsium Trifluorazetat	GE Healthcare, Piscataway NJ, USA
Diethylpyrocarbonate (DEPC)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinhausen, Deutschland
LE Agarose	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf, Deutschland
Ethanol absolut	Merck KG, Darmstadt, Deutschland
Ethidiumbromid	Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz
di-Formamid	Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz
Generuler™ 100bp Plus DNA Ladder	Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland
Glycogen	Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland
Hydrogenperoxid (H ₂ O ₂), 30%	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe, Deutschland
Isopropanol (2-Propanol)	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe, Deutschland
Kaliumazetat	J. T. Baker, Deventer, Niederlande
Natriumazetat	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe, Deutschland
Natriumchlorid (NaCl)	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe, Deutschland
Polyethylenglycol-6000 (PEG-6000)	Fluka Bio Chemika, Buchs, Schweiz
Salzsäure (HCl)	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe, Deutschland
SDS 10%	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe, Deutschland
SYBR® Green I	Cambrex Bio Science, Rockland, ME, USA
Tris-HCl pH 8	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe, Deutschland
Wasserstoffperoxid (H ₂ O ₂) 30%	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe, Deutschland

Tab.4: Liste der verwendeten Kits

Kit	Hersteller
AccessQuick RT-PCR System	Promega Corp., Madison, MI, USA
Agencourt® RNAClean® XP	Beckman Coulter, Beverly, MA, USA
Fast SYBR® Green Master Mix	Applied Biosystems, Lincoln, CA, USA
QIAquick® PCR Purification Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
Quant-iT™ RiboGreen® RNA Reagent and Kit	Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, USA
RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis Kit	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, Deutschland
TURBO DNA-free™ Kit	Applied Biosystems, Lincoln, CA, USA

Tab.5: Verwendete Software

Software	URL	Referenz
BLAST (Basic local alignment search tool)	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST	Altschul <i>et al.</i> 1990
Peak Scanner 1.0	http://www.appliedbiosystems.com/peakscanner	unpubliziert

Puffer und Medien:

MQ_{DEPC}: 0,1 % (v/v) Diethylpyrocarbonat
1000 ml Milli-Q

Unter einem Abzug über Nacht am Magnetrührer gerührt, anschließend autoklaviert.

50X TAE Puffer pH 8

Tris 2M
EDTA 50 mM
Natriumazetat 500 mM

50X TBE Puffer

Tris 890 mM
Borsäure 890 mM
EDTA 20 mM

Ethidiumbromid Lösung

EthBr 100 µl
1 Liter MQ_{bidest}

M9 Minimalmedium

- a. zu 800 ml MQ_{bidest} gibt man:
 - 64 g Na₂HPO₄₋₇H₂O
 - 15 g KH₂PO₄
 - 2.5 g NaCl
 - 5.0 g NH₄Cl
 - auf 1000 ml auffüllen
 - autoklavieren
- b. Zu 700 ml MQ_{bidest} fügt man:
 - 200 ml der M9 salze
 - 2 ml 1M MgSO₄ (sterile)
 - 20 ml 20% Azetat
 - 100 ul 1M CaCl₂ (sterile)
- c. Mit MQ_{bidest} auf ein Gesamtvolumen von 1000 ml auffüllen.

2.4. Inkubation

Die Sedimentproben wurden im Verhältnis 1:1 mit sterilisiertem, synthetischem und anoxischem Meerwasser (Instant Ocean®, L'amie Cahuete – Aquarium Systems, Saarebourg Cedex, Frankreich) gemischt, auf 12 sterile 100 ml Serumflaschen zu je 50 ml aufgeteilt und bei Dunkelheit und 0°C unter anaeroben Bedingungen inkubiert. Alle dafür vorgesehenen Flaschen und Verschlüsse wurden vor ihrer Verwendung mit 1% Oxalsäure und MQ_{bidest} gereinigt, danach getrocknet und autoklaviert.

2.5. Versuchsaufbau

Die Proben aus Station J sowie aus Station AH wurden auf drei Replikate aufgeteilt. Jede dieser Teilproben wurde in vier unterschiedlichen Ansätzen mit ¹³C Azetat (98 Atomprozent ¹³C), ¹²C Azetat und ¹³C Azetat mit Molybdat als Inhibitor (Sørensen 1981; Boschker et al. 1998) inkubiert (siehe Abb.5). Ein weiterer Ansatz wurde unbehandelt inkubiert um mögliche Flascheneffekte zu überprüfen. Dazu wurden jeweils 50 mM ¹²C- und ¹³C Azetatlösungen und eine 1 M Molybdatlösung hergestellt. Die Substrate wurden jeweils für ca. 15 min mit N₂ gespült, geschüttelt und stehen gelassen um Sauerstoff aus den Flüssigkeiten diffundieren zu lassen. Dieser Vorgang wurde 2 mal wiederholt. Anschließend wurden die Azetatlösungen auf 5 mM verdünnt und im Verhältnis 1:100 der Sedimentprobe zugegeben wodurch eine 50 µM Verdünnung entstand. Zur inhibierten Probe wurde Molybdat mit einer Konzentration von 5 mM (Boschker *et al.* 1998) zugegeben.

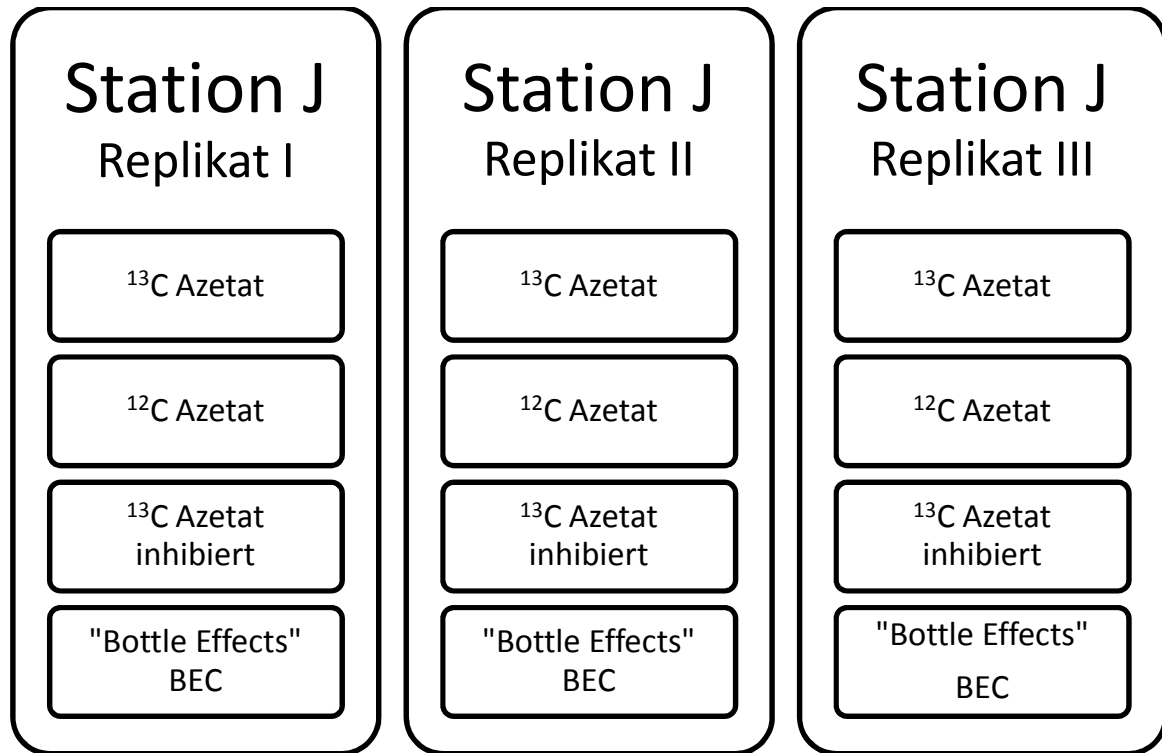


Abb.5: Schematische Einteilung der zwölf inkubierten Proben aus Station J. Die entnommenen Proben wurden auf drei Replikate mit jeweils vier unterschiedlichen Substratadditionen aufgeteilt.

2.6. Zeitlicher Ablauf

Die Substratzugabe erfolgte über einen Zeitraum von 3 Wochen täglich, vor Wochenenden wurde aus logistischen Gründen die 3fache Menge an Azetat zugegeben (siehe Tab.6). Da ab dem ersten Tag der Inkubation bis zum vierten Tag täglich Teilproben entnommen wurden, wurde die Menge der Substrate angepasst. Die Probennahmen erfolgten unter anaeroben Bedingungen jeweils direkt nach der Substratzugabe. Die Proben wurden in 2 ml Gefäßen bei -80°C gelagert.

Die Schritte des Stable Isotope Probing wurden mit *E.coli* Kulturen durchgeführt um die methodische Vorgehensweise zu prüfen. Dazu wurde ein *E.coli* Stamm K12 für drei Tage bei 37°C unter aeroben Bedingungen auf M9 Medium kultiviert. Dieses Minimalmedium beinhaltete als einzige C-Quelle ^{13}C bzw. ^{12}C -Glucose.

Tab.6: Zeitliches Schema der Azetatinkubation. Tabelle enthält die Zeitpunkte und Menge der Substrataddition sowie Entnahme von Unterproben

Datum	Tag	Substratzugabe	Entnahme der Proben (RNA, Azetat, FISH)
27.09.2010	d0	500 µL Molybdat (3x) 1000 µL Azetat (9x)	6,5 mL Probe
28.09.2010	d1	280,5 µL (9x)	5,5 mL Probe
29.09.2010	d2	264 µL (9x)	5,5 mL Probe
30.09.2010	d3	247,5 µL (9x)	6,5 mL Probe
01.10.2010	d4	684 µL (9x)	6,5 mL Probe
04.10.2010	d7	208,5 µL (9x)	6,5 mL Probe
05.10.2010	d8	189 µL (9x)	
06.10.2010	d9	189 µL (9x)	6,0 mL Probe
07.10.2010	d10	171 µL (9x)	
08.10.2010	d11	513 µL (9x)	6,0 mL Probe
11.10.2010	d14	153 µL (9x)	6,0 mL Probe
12.10.2010	d15	135 µL (9x)	
13.10.2010	d16	135 µL (9x)	6,0 mL Probe
14.10.2010	d17	117 µL (9x)	
15.10.2010	d18	351 µL (9x)	6,0 mL Probe (12x)
18.10.2010	d21	99 µl (9x)	5,5 mL Probe (12x)

2.7. Sulfatreduktionsraten (SRR)

Teilproben der Sedimente aus Station J wurden an die Universität Aarhus gesendet wo mittels einer kalten Chrom-Destillation (Kallmeyer *et al.* 2004) die Sulfatreduktionsraten der Proben gemessen wurden. Den Proben wurde parallel zu jenen in Österreich entsprechende Mengen an ^{12}C und ^{13}C Azetat sowie Molybdat für die inhibierte Probe zugegeben.

2.8. RNA Isolation

Um metabolisch aktive, potentiell sulfatreduzierende Organismen der Proben zu identifizieren, werden jene Bakterien gesucht, welche das markierte Azetat aufgenommen und in die Zellbestandteile eingebaut haben. Da der markierte Kohlenstoff schneller in RNA als in DNA inkorporiert wird, ist es von Vorteil RNA zu extrahieren und zu vergleichen. Die RNA Isolierung aus marinen Sedimenten ist besonders schwierig, da der Anteil an Huminsäuren und anderen Stoffen des Sediments hoch ist, welche eine effiziente RNA Isolierung hemmen können.

Für die Isolation von RNA aus den Proben wurde ein Protokoll, modifiziert nach Lüders *et al.* (2004) angewandt. Dabei wurde eine Teilprobe mit einem Volumen von 2 ml auf vier Replikate zu je 500 µl aufgeteilt und in einer Pufferlösung aus 250 µl Triisopropylnaphtalat-Sulfonsäure (TNS) Lösung und

750 µl 120 mM NaPO₄ in einem lysing Matrix A - 'bead-beating' Gefäß homogenisiert. Danach wurden Nukleinsäuren in einer Phenol-/Chloroform-/Isoamylalkohol-Mischung extrahiert. In einem weiteren Schritt wurden Huminsäuren und andere Kontaminationen in 7,5 M Natrium-Azetat für eine Stunde gefällt (Bodrossy *et al.* 2006). Danach wird die RNA in PEG 6000x gefällt, mittels 70% Ethanol aufgereinigt und in 30 µl MQ_{DEPC} resuspendiert.

Zur zusätzlichen Aufreinigung wurde eine Phenol-Chloroform Lösung von Invitrogen verwendet. Dabei wird die RNA in TRIzol® Reagenz gelöst, für 10 min in Isoamylalkohol gefällt und zweimal mit 75% EtOH gewaschen. Das RNA Pellet wird an der Luft getrocknet und in 30 µl MQ_{DEPC} resuspendiert.

Zur Kontrolle wurde die RNA Konzentration mittels NanoDrop ND-1000 Spektrophotometer gemessen. Grundlage dieser Messung ist die Ermittlung der Absorptionsrate der, sich in Lösung befindlichen Nukleinsäuren bei einer Wellenlänge von 254-260 nm. Da Phenol, Proteine und andere Verunreinigungen der RNA andere Extinktionsmaxima aufweisen, wird auch das Verhältnis der Absorption bei 230 und 280 nm zu 260 nm berechnet. Durch einen Vergleich der Absorptionswerte bei 230, 260 und 280 nm kann nicht nur die Quantität, sondern auch die Reinheit der RNA gemessen werden.

Um sicher zu gehen, dass sich keine DNA in den Proben befand wurde mit den RNA Lösungen eine PCR mit 30 Zyklen und bakteriellen 16S rRNA Primern 616V und 907R (siehe Tab. 7) durchgeführt und die PCR Produkte anschließend auf ein 1% Agarose-Gel aufgetragen.

Tab.7: Liste der verwendeten Primer zur reversen Transkription, qPCR und PCR

Primer	Sequenz 5' – 3'	Referenz
1492R	GGYTACCTTGTTGTTACGACTT	Loy et al. (2002)
909F	ACTCAAAGAATWGACGG	Berry et al. (2011)
616V	AGAGTTTGATYMTGGCTC	Edwards et al. (1989)
907R	CCGTCAATTCMTTGGAGTTT	Muyzer et al. (1995)

2.9. Isotopen Massenspektrometrie

Um den Einbau der ¹³C Atome in die RNA zu bestätigen, wurde eine massenspektrometrische Messung (IRMS) durchgeführt. Es wurde auch ein *E.coli* Stamm in M19 Minimalmedium mit ¹²C-Glucose und ¹³C-Glucose gezüchtet um einen Vergleich zu RNA aus den Umweltproben zu haben. Dazu wurden rund 500 ng RNA in Lösung in Zinnkapseln (IVA Analysetechniken, Düsseldorf, Deutschland) im Inkubator bei 60°C über Nacht getrocknet. Um Vergleichswerte zu erhalten wurden mit dem Massenspektrometer leere Kapseln gemessen. Natürlich vorkommende Mengen an Isotopen werden in delta Werten angegeben, welche die Abweichung des Isotopenverhältnisses von einem internationalen Standard in Promille angeben. Als Standard dient laut der internationalen

Atomenergie Behörde der Vienna Pee Dee Belemnite (Peterson & Fry, 1987). Aus den erhaltenen $\delta^{13}\text{C}$ Werten, kann in Folge der Anteil der Isotopen in Atomprozent angegeben werden. Die Isotopische Zusammensetzung wird relativ zu einem Standard angegeben und berechnet sich aus:

$$\delta[\text{‰}] = \left(\frac{R_{\text{Probe}}}{R_{\text{Standard}}} - 1 \right) \cdot 1000$$

R beschreibt das Verhältnis von schweren zu leichten Isotopen: $R = \frac{^{13}\text{C}}{^{12}\text{C}}$

Aus der untersuchten Kohlenstoffmenge, ist der Anteil der ^{13}C Atome in Prozent über die angegebene Formel zu berechnen:

$$\text{atom}\% \text{ } ^{13}\text{C} = \frac{^{13}\text{C}}{^{12}\text{C} + ^{13}\text{C}} \cdot 100$$

2.10. Ultrazentrifugation

Die extrahierte RNA besteht aus leichter RNA metabolisch inaktiver Zellen und schwerer RNA aus Organismen welche ^{13}C -Kohlenstoff über Azetat inkorporierten und als Baustein für RNA nutzten. Um die RNA der Dichte nach aufzutrennen wurde eine Ultrazentrifugation nach Whiteley *et al.* (2007) durchgeführt. Dazu wurde eine Zentrifugationslösung aus Cäsiumtrifluorazetat (CsTFA) (GE Healthcare, Piscataway, NJ, USA) mit einer Dichte von 2 g ml^{-1} verwendet. Mit di-Formamid und MQ_{DEPC} wird eine Dichte der CsTFA-Lösung von $1,8 \text{ g ml}^{-1}$ hergestellt (Manefield *et al.* 2002). Die Messung des Brechungsindex erfolgt mittels eines digitalen Refraktometers. Um daraus die Dichte der Lösung zu ermitteln wurde eine Standardkurve erstellt wobei zusätzlich das Gewicht der Proben ermittelt wurde (siehe Anhang Abb.A1). Alle Messungen des Gewichts und des Brechungsindex wurden bei 20°C durchgeführt.

4,9 ml des Gradientenpuffers beinhalten 500 ng RNA wurden in ein Optiseal Zentrifugationsgefäß (Beckman Coulter, Fullerton, CA, USA) gegeben und mit entsprechenden, gegengesetzten Gefäßen auf $\pm 1 \text{ mg}$ austariert. Unter Verwendung eines Vti 90 Festwinkelrotors (Beckman Coulter, Fullerton, CA, USA) wurden die Proben für ca. 70 Stunden bei $177\,000 \text{ g}$ zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurde MQ_{DEPC} mit konstantem Druck auf den Gradienten geleitet. Ein Tygon Schlauch wurde mit NaOH und 70% EtOH gereinigt und luftblasenfrei mit MQ_{DEPC} gefüllt. Das Zentrifugationsgefäß wird mit einer sterilen Nadel oben und unten angestochen und von oben mit Wasser gefüllt. Der unten austretende Zentrifugationspuffer wird zu $250 \text{ }\mu\text{l}$ Fraktionen in zwanzig $1,5 \text{ ml}$ Reaktionsgefäßen aufgefangen. Um die Bildung des Gradienten zu bestätigen wurden jeweils $50 \text{ }\mu\text{l}$ jeder Fraktion zur Dichtemessung mittels Refraktometer verwendet. Die RNA wurde daraufhin in 2 Volumen eiskaltem Isopropanol und $20 \text{ }\mu\text{g}$ Glycogen über Nacht bei -20°C gefällt. Nach einer folgenden Zentrifugation

(30 min, 20 6810g, 4°C) wurde die pelletierte RNA zweimal mit eiskaltem 70% EtOH gewaschen, luftgetrocknet und in 30 µl MQ_{DEPC} resuspendiert.

2.11. Reverse Transkriptions-PCR (1-step)

Um die bereits zentrifugierte RNA in cDNA umzuschreiben wurde das Access RT-PCR System (Promega Corp., Madison, MI, USA) verwendet. Vorteil dieses Kits ist, dass zwei unterschiedliche enzymatische Reaktionen im selben Reaktionsgefäß stattfinden, weshalb die Wahrscheinlichkeit einer Kontamination im Labor verringert wird. Das Kit beinhaltet eine AMV reverse Transkriptase des Avian Myeloblastosis Viruses für die Synthese des ersten DNA Stranges. Dieser Vorgang dauerte 45 min bei der optimalen Temperatur des Enzyms von 45° C. Um das Enzym anschließend zu denaturieren, wurde die Probe für 2 min auf 94° C erhitzt. Danach erfolgte eine PCR mit 23 Zyklen, beginnend mit einem 30 sek dauerendem Denaturationsschritt bei 94°C. Anschließend folgte ein einminütiges Annealing bei 54°C und die Elongation für zwei Minuten bei 68°C. Die PCR wird mit einer abschließenden Elongation für 7 Minuten bei 68° C beendet.

Um die idealen Primer für eine effiziente Amplifikation der 16S rRNA zu finden wurden zwei unterschiedliche Primerpaare getestet. Dabei handelte es sich um zwei universelle bakterielle Primer 907R und 616V (Tab.8) welche den vorderen Teil der 16S rRNA und weiteres Paar welches den hinteren Teil der 16S rRNA amplifiziert (1492R und 909R, Tab.8). Alle verwendeten Primer stammen von Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham MA, USA).

Die Reagenzien wurden nach dem Schema des Herstellers in Tab.9 pipettiert. Es wurden PCR Ansätze zu 50 µl pipettiert. Dabei wurden 2 µl RNA und je 0,5 µl Vorwärts- und Rückwärtsprimer eingesetzt. Die Enzyme Reverse Transkripton und DNA Polymerase wurden zu 1 µl beigegeben sowie 2 µl MgSO₄ und 1 µl dNTP Mix. Es wurden 10 µl Reaktionspuffer benötigt und 32 µl Wasser eingesetzt. Zu den Proben, wurden zusätzlich eine Positivkontrolle (RNA aus *E.coli* Stämmen) sowie eine Negativkontrolle mit MQ_{DEPC} durchgeführt.

PCR Produkte wurden mit dem QIAquick® PCR Purification Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland) aufgereinigt und am NanoDrop 1000 Spektrophotometer die Konzentration der Nukleotide gemessen.

2.12. Reverse Transkription

Da mittels RT-PCR zu wenig PCR Produkte für T-RFLP Analyse erhalten wurden, wurde die reverse Transkription unabhängig einer PCR durchgeführt. Das hat den Vorteil, dass anschließend eine quantitative PCR (qPCR) durchgeführt werden kann um eine verlässliche Kontrolle der Verteilung der RNA über den Dichtegradienten zu erhalten.

Die reverse Transkription wurde unter Verwendung des RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis Kits (Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, Deutschland) durchgeführt. Zu 5 µl RNA jeder Dichtefraktion wurden 25 pmol 1492R Primer pipettiert welcher sich bei vorhergehenden Tests als sehr effizient erwies. Puffer und Enzyme wurden nach Protokoll des Herstellers hinzugefügt (siehe Tab.8). Die Reaktion wurde für 1 h bei 42°C im Thermocycler inkubiert.

Tab.8: Pipettierschema für eine reverse Transkription von RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis Kit.

Lösung	Menge [µl]
RNA	5
Primer (50 pmol/µl)	0,5
H ₂ O _{DEPC}	6,5
5X Reaktionspuffer	4
RiboLock™ RNase Inhibitor (20 u/µl)	1
10 mM dNTP Mix	2
RevertAid™ M-Mul V Reverse Transkriptase (200 u/µl)	1

2.13. Quantitative PCR

Um die Verteilung der RNA über den Gradienten zu messen wurde nach der reversen Transkription eine real-time PCR mit 5 µl RNA jeder der 20 Fraktionen durchgeführt. Eine quantitative PCR dient zur Bestimmung der Kopienzahl einer Sequenz in untersuchten Proben. Dazu wurden 40 PCR Zyklen im iCycler IQ Thermocycler (BioRad Laboratories, München, Deutschland) durchgeführt. Als Primer wurden die Primer 1389F und 1492R eingesetzt. Weiters wurden zu 5 µl RNA 25 µl eines im Fast SYBR® Green Master Mix enthaltenen Supermixes und 17,5 µl H₂O_{DEPC} pipettiert. Zusätzlich wurden pro Probe 0,5 µl Fluorescein zugegeben. Verdoppelt sich die Menge der PCR-Produkte nach jedem PCR Schritt, hat die PCR eine Effizienz von 100%. Dabei ist eine Steigerung der Fluoreszenz um den Faktor zwei messbar. Nach einer gewissen Anzahl an Zyklen übersteigt die Intensität einen Schwellenwert (threshold). Es wurden DNA Standards mit bekannter Konzentration hergestellt, in der qPCR amplifiziert und eine Eichgerade erstellt. Dafür wurden 16S rRNA Sequenzen von *Synthrophobacter wolinii* (Friedrich 2002) in Triplikaten in sechs um den Faktor 10 verschiedenen Konzentrationen verwendet. Die Umweltproben wurden in Duplikaten gemessen.

2.14. RNA Quantifizierung durch RiboGreen®

Als Methode um den RNA Gehalt in den einzelnen Fraktionen zu bestimmen wurde das Quant-iT™ RiboGreen® RNA Kit (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) angewandt. Dabei wurden 5 µl RNA Lösung verwendet und das Protokoll des Herstellers für „low-range approach“ gewählt. Beim RiboGreen® Reagenz handelt es sich um einen Fluoreszenzfarbstoff welcher an RNA bindet und in gebundenem Zustand ein Anregungsmaximum von ~ 500 nm und ein Emissionsmaximum bei ~525 nm aufweist. Um eine Standardkurve herzustellen, wurde im Kit enthaltene RNA verdünnt und in Duplikaten in den Konzentrationen 50, 25, 10, 5, 2, 1 ng/ml und ohne RNA aufgetragen. Zu allen Proben wurden 100 µl 2000fach verdünnter RiboGreen® Farbstoff pipettiert und in Dunkelheit für 10 min inkubiert und anschließend wurden die Fluoreszenzintensitäten mittels Infinite 200 Microplate Reader (Tecan Group, Männedorf, Schweiz) gemessen. Die Messung der Proben für die Standardkurve und der Umweltproben bzw. *E.coli* erfolgte zeitgleich.

2.15. PCR

Da für eine T-RFLP Analyse einer mikrobiellen Gemeinschaft 100 ng DNA benötigt werden ist eine PCR der cDNA notwendig. Vor allem für Fraktionen höherer Dichte, ist eine Amplifikation der Nukleotide notwendig, da ein geringer RNA Gehalt erwartet wird.

2 µl der synthetisierten cDNA wurden als Vorlage für eine PCR (25 µl Gesamtvolumen) herangezogen. Als amplifizierendes Enzym wurde eine Taq Polymerase (Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland) eingesetzt. Für die T-RFLP Analyse ist eine Markierung der PCR Produkte durch einen Fluoreszenzfarbstoff notwendig. Dazu wurde der 616V Primer mit Fluorescein Amidite (FAM) Markierung am 5' Ende gewählt (Tab. 14). Vergleichende Tests zeigten, dass unter Verwendung von FAM markierten Primern mehr OTUs identifiziert werden können als mittels Hexachlor-Fluorescein (HEX) markierten Primern (Pandey *et al.* 2007).

Um die optimalen Bedingungen für eine hohe Effizienz der PCR zu ermitteln, wurden einige Parameter verändert. Die Konzentrationen von MgCl₂ und der Taq Polymerase erhöht, die Annealing und Elongationsdauer erhöht und die ideale Anzahl an PCR Zyklen ermittelt.

2.16. Gelelektrophorese

Um ein 1,5 % Agarosegel herzustellen wurde Agarose in 150 ml 1xTBE Puffer gelöst und in der Mikrowelle aufgeköcht. Die Lösung wurde in einen Gelschlitten gegossen und ein Kamm für die Erhaltung von Hohlräumen im Gel darin fixiert. Nach der Polymerisation wird das Gel in eine mit TBE Puffer gefüllte Gelwanne gegeben und in die Hohlräume die Nukleinsäuren mit 6X DNA Loading Dye (Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland) pipettiert. Zur Auftrennung der negativ geladenen Nukleotide wird ein elektrisches Feld mit einer Spannung von 90 Volt für 90 min angelegt. Um die Fragmente sichtbar zu machen, wird danach das gesamte Gel für 30 min in einer Ethidiumbromid-Lösung gefärbt. Anschließend wird das Gel am Transilluminator (Biostep GbmH, Jahnsdorf, Deutschland) mit UV-Licht ($\lambda = 312 \text{ nm}$) bestrahlt, wodurch an Nukleotide gebundenes Ethidiumbromid sichtbar wird.

2.17. Agencourt RNA clean up system

Um PCR Produkte aufzureinigen, also restliche Primer, Nukleotide, Enzyme, Salze etc. zu entfernen wurde das Agencourt RNA clean up Kit (Beckman Coulter Genomics, Bernried, Deutschland) angewandt welches sowohl für RNA als auch cDNA verwendet werden kann. Dabei bindet DNA an paramagnetische Kügelchen während drei Waschschrötte mit 70% EtOH erfolgen. Dann wird die DNA 10 min getrocknet und danach in MQ_{DEPC} eluiert.

2.18. Terminale Restriktionsfragment Längenpolymorphismus Analyse (T-RFLP)

Um zu ermitteln, ob Organismen der bakteriellen Gemeinschaft ¹³C-Azetat aufgenommen und eingebaut haben, werden die einzelnen Fraktionen mit einem Restriktionsenzym verdaut und eine T-RFLP Analyse durchgeführt. Dabei wird PCR Produkten ein Restriktionsenzym zugegeben, welches DNA bei einer bestimmten Sequenz von vier Basen schneidet. Durch das Vorkommen vieler unterschiedlicher Sequenzen in der mikrobiellen Gemeinschaft, entstehen Fragmente unterschiedlicher Längen. Da diese mit einem fluoreszierenden Farbstoff markiert sind, wird die Länge der Fragmente im Vergleich zu einem Längenstandard gemessen. Die Intensität des Fluoreszenzsignals korreliert mit der Menge der Fragmente.

Die Quantifizierung der aufgereinigten PCR Produkte erfolgte mittels NanoDrop Spektrophotometer. Für die Fraktionen 21-19 wurden jeweils 100 ng DNA herangezogen, für die restlichen Fraktionen die für den Verdau maximale Menge von 16 µl. Dazu wurde die entsprechende Menge DNA und 2 µl Tango 10X Buffer sowie 2 µl Msp I (Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland) in ein Eppendorf Reaktionsgefäß gegeben und mit MQ_{DEPC} auf 20 µl aufgefüllt. Msp I erkennt die Sequenz der Basen

CCGG und fragmentiert die DNA zwischen den Cytosin Nukleotiden. Dies wurde im Thermocycler für 3 h bei der optimalen Aktivitätstemperatur des Enzyms (37° C) inkubiert, danach die enzymatische Reaktion mit einer Temperaturerhöhung auf 65° C für 20 min gestoppt.

Dauert der Verdau durch das Restriktionsenzym zu lange, werden PCR Produkte degradiert. Ist andererseits die Dauer des Verdaus zu kurz, werden die Proben nicht vollständig geschnitten. Das optimale Verfahren der Restriktion wurde mit je 15 ng der Plasmide H-2, D-1, I-14, J-1 (Loy *et al.* 2005) gepoolt und für 1 h, 3 h, 8 h und 16 h mit Msp I ermittelt.

Die Fragmente wurden nach dem Verdau entsalzt, um die Bestandteile des Puffers und das Enzym zu entfernen. Dazu wurde MQ_{bidest} in eine Petrischale gegeben und ein Millipore V dialysis Filter (Millipore, Billeri Massachusetts) mit einer Porengröße 0,0025 µm vorsichtig auf der Wasseroberfläche platziert. Die gesamte Probe wurde auf den Filter pipettiert und unter einer Abdeckung für 30 min stehen gelassen, wobei Salze, Enzyme und auch kleinere Fragmente ins Wasser diffundieren.

Anschließend wurden 4 µl der entsalzten Probe zu 10 µl Hi-DiTM Formamide (Applied Biosystems Inc. Lincoln CA, USA) und 0,25 ml LIZ 1200 (Applied Biosystems Inc., Lincoln CA, USA) Ladder pipettiert. Danach wurden die Proben für 3 min bei 95° C denaturiert und anschließend sofort für 10 min auf Eis abgekühlt. Die Analyse der Fragmente wurde von einem DNA Sequenzierer 3130 (Applied Biosystems Inc., Lincoln CA, USA) durchgeführt und die T-RFLP Profile mittels Peak Scanner 1.0 Software (Applied Biosystems Inc., Lincoln CA, USA) verglichen. Dazu wurden die X-Achsen von 0-800 bp und Y-Achsen von 0 – 900 Fluoreszenzeinheiten standardisiert.

In einer Publikation über thermophile Bakterien arktischer, mariner Sedimente Svalbards wurden bereits Sequenzen des gleichen Habitats veröffentlicht (Hubert *et al.* 2010). Von publizierten Sequenzen in Microsoft Excel die Msp I Schnittstelle ermittelt und geschnitten. Die Länge der auf diese Weise erhaltenen Fragmente konnte anschließend mit den T-RFs der der Inkubationen verglichen werden.

3. Ergebnisse

3.1. *E.coli* Dichtegradientenzentrifugation

Nach Anwendung des modifizierten RNA Isolationsprotokolls nach Lüders (2004) und einer TRIzol® Reextraktion wurde die RNA der *E.coli* Kulturen am Spektrophotometer vermessen. Aus den Reinkulturen konnten über 900 ng/μl RNA gewonnen werden. Bei einem Volumen der RNA in Lösung von 50 μl liegt die durchschnittliche Konzentration bei 1240,93 ng/μl. Das Verhältnis der Absorptionswerte bei 260/280 nm entspricht nahezu einem Sollwert von zwei (siehe Tab.9).

Tab.9: Ergebnisse der photometrischen Messung der RNA Isolate der *E.coli* Kulturen beinhaltend die Konzentration an RNA pro μl und die Absorptionsverhältnisse von 260/280 und 260/230 nm. *E.coli* ¹²C wurde mit ¹²C-Glukose und *E.coli* ¹³C mit ¹³C markierter Glukose kultiviert.

Probe	Volumen	Konzentration [ng/μl]	260/280	260/230
<i>E. coli</i> ¹² C	50 μl	1 504,46	1,98	1,83
<i>E. coli</i> ¹³ C	50 μl	977,4	2,01	2,21

Die RNA Proben wurden mittels eines Massenspektrometers untersucht um Unterschiede der isotopischen Zusammensetzung festzustellen. Die Probe der ¹³C RNA erreichte ein δ¹³C von 67 804 hingegen die ¹²C RNA nur -6,653 (siehe Tab.10). Das heißt ebenfalls, dass es sich unter Einbeziehung des gesamten Kohlenstoffanteils der Probe bei über 43% aller Kohlenstoffatome der Probe um ¹³C Atome handelt. Die auf ¹³C Glucose gewachsene *E.coli* Kultur wurde erwartungsgemäß sehr stark markiert. Da zu 99% ¹³C markierte Glucose eingesetzt wurde welche zudem als einzige Kohlenstoffquelle dient, ist nicht klar, warum die die Probe der ¹³C RNA nicht nahezu vollständig aus ¹³C-Atomen besteht.

Tab.10: Angaben über das Verhältnis von ¹³C zu ¹²C Isotopen in RNA Proben aus zwei unterschiedlich kultivierter *E.coli* Kulturen, sowie der Anteil an ¹³C Kohlenstoff in Prozent.

RNA Probe	δ 13C/12C	13C [%]
<i>E.coli</i> ¹² C	-6,6525	1,0984
<i>E.coli</i> ¹³ C	67804,6	43,4788

Als weitere Methode den Einbau an ¹³C Isotopen zu überprüfen ist die Verteilung der RNA nach der Zentrifugation über den Dichtegradienten zu untersuchen. Das ermöglichte auch die verwendeten Methoden der Dichtezentrifugation, Fraktionierung etc. zu testen. Dazu wurden Messungen mittels des Farbstoffes RiboGreen® (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, USA) der einzelnen Fraktionen durchgeführt. Es wurde ein mit ¹²C oder ¹³C-Glukose kultivierter *E.coli* Stamm zentrifugiert. Um die Verteilung von ¹³C und ¹²C RNA der *E.coli* Kulturen über den Gradienten zu prüfen, wurden ¹²C und ¹³C RNA Proben einzeln, sowie jeweils 250 ng RNA beider *E.coli* Kulturen in einem Gradienten gemischt und zentrifugiert. Abb.6A zeigt den RNA Gehalt in den jeweiligen Dichtefraktionen der

Gradienten mit jeweils 500 ng ^{13}C bzw. ^{12}C RNA in einem Graphen geplottet. Die Y-Achse beschreibt die aus den Fluoreszenzwerten berechnete Menge an RNA pro Fraktion (ng/Fraktion), die X-Achse beschreibt die Bouyant Dichte. Die ‚schwere‘ RNA verteilt sich rund um eine Dichte von $1,81 \text{ g ml}^{-1}$. Im Gradienten indem sich ^{12}C RNA befand, ist diese rund um eine Dichte von $1,77 \text{ g ml}^{-1}$ gehäuft.

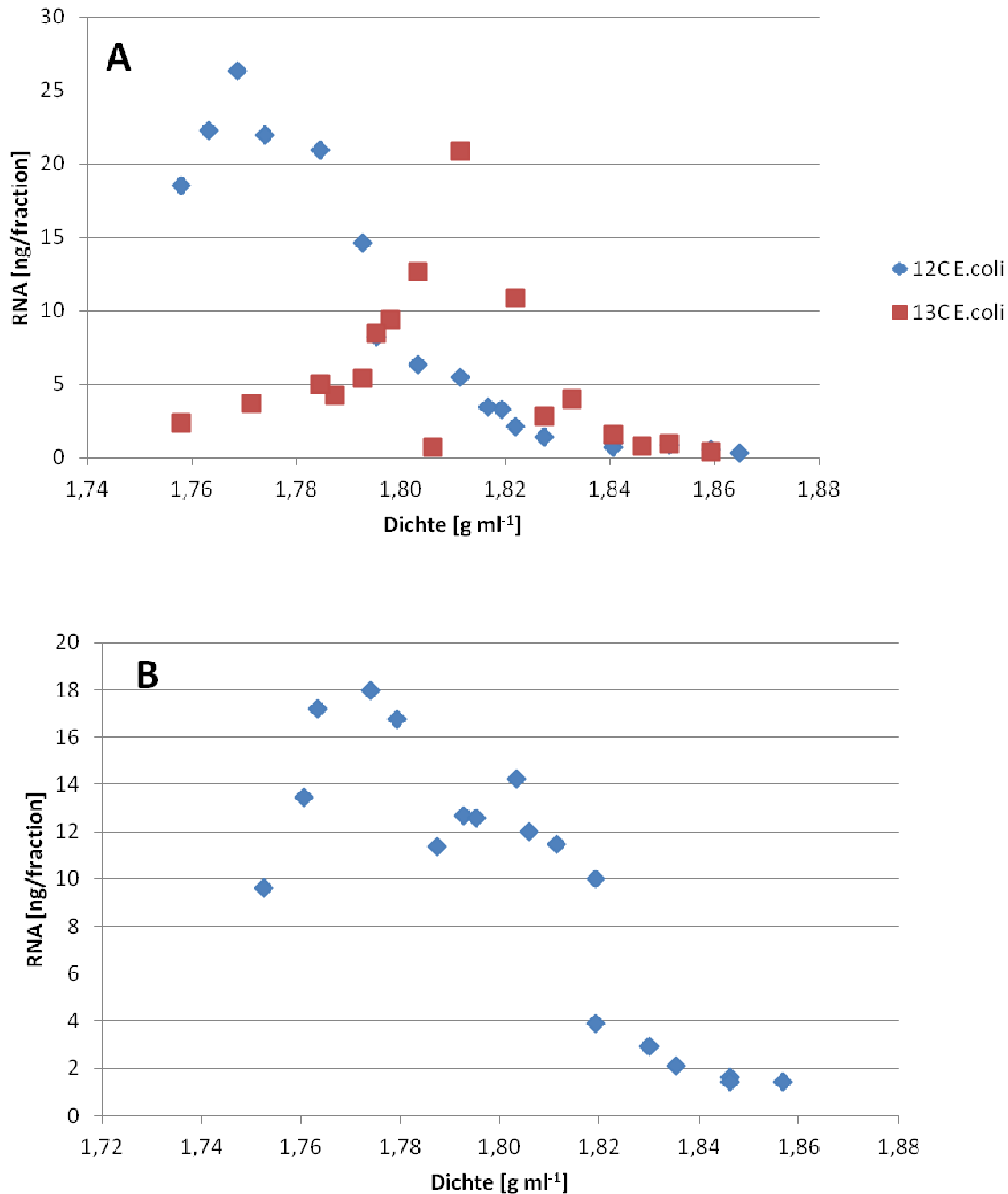


Abb.6: Verteilung innerhalb der Dichtegradienten von RNA aus *E.coli* Kulturen. Isolierte RNA aus *E.coli* mit ^{12}C - und ^{13}C -Azetat Inkubation separat zentrifugiert (A) oder jeweils 250 ng RNA aus beiden Kultivierungen in einem Gradienten zentrifugiert (B).

In einem weiteren Gradienten, welcher gleichermaßen ^{12}C sowie ^{13}C RNA enthält, sind 2 signifikante Peaks bei einer Bouyant-Dichte von $1,81$ sowie $1,77$ erkennbar (siehe Abb.6B). Die Peaks im Gradienten gemischter RNA befinden sich im gleichen Dichtebereich wie bei separaten

Zentrifugationen. Daher kommt es bei der eingesetzten Menge an RNA, dem Zentrifugationspuffer und den verwendeten Bedingungen (Dauer, Geschwindigkeit) zu einer korrekten Trennung der isotopisch unterschiedlich aufgebauten RNA Proben.

Eine derart starke Markierung der RNA wie in der *E.coli* Kultur, ist bei Umweltproben nicht zu erwarten. Dies kann dazu führen, dass der Unterschied zwischen den ^{12}C - und ^{13}C -Gradientenfractionen mit der höchsten RNA Konzentration wesentlich geringer ist, als $\sim 0.04 \text{ g ml}^{-1}$ bei Reinkulturen (Lüders *et al.* 2004).

3.2. Methodische Optimierung

3.2.1. Reverse Transkriptions-PCR (1-step)

Auf einem Agarosegel wurden PCR Produkte des Gradienten der Probe Station J d21 ^{12}C RNA der 1-Schritt rt-PCR visualisiert. Es wurde ein Vergleich zwischen Primerpaaren 909F und 1492R sowie 616V und 907R durchgeführt. Während die Amplifikation der cDNA unter Verwendung der Primer 909F und 1492R keine Banden lieferte, konnten PCR Produkte der Primer 616V und 907R nachgewiesen werden (siehe Abb.7). Fraktionen 6, 7 und 8 wurden zusätzlich 1:10 verdünnt. Bei diesen Proben konnten keine Banden verzeichnet werden.

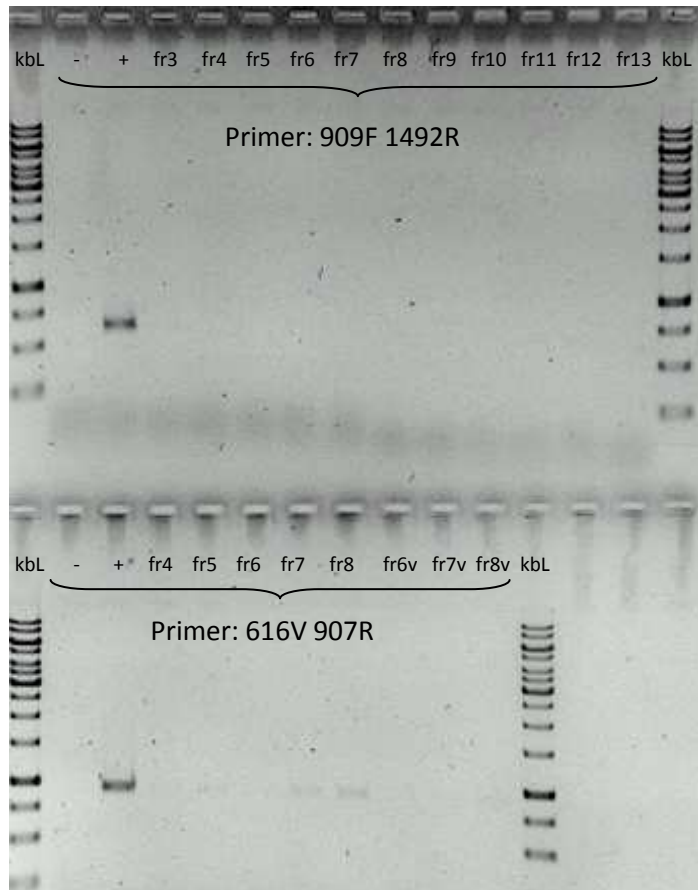


Abb.7: Vergleich von PCR Produkten der Primerpaare: 909F – 1492R und 616V - 907R nach einer rt-PCR mit 23 Zyklen.

Für eine T-RFLP Analyse war die erforderliche Menge von 100 ng PCR Produkten in Fraktionen hoher Dichte nach Aufreinigung der PCR Produkte nicht vorhanden. Versuchsweise wurde cDNA aus schweren Fraktionen für die PCR verdünnt um eine eventuelle Inhibierung der PCR zu vermeiden. Ein weiterer Versuch drei gleiche PCR Ansätze mit ein und derselben Probe durchzuführen und nach der Aufreinigung der PCR Produkte zu poolen, scheiterte. Das heißt es wurde nicht genügend DNA generiert um eine T-RFLP Analyse durchzuführen.

Da für eine T-RFLP Analyse einer mikrobiellen Gemeinschaft 100 ng DNA benötigt werden ist eine PCR der cDNA notwendig. Vor allem für Fraktionen höherer Dichte, ist eine Amplifikation der Nukleotide notwendig, da ein geringer RNA Gehalt erwartet wird.

3.2.2. MgCl_2 und Taq Polymerase Konzentrationen

Um eine größere Menge an PCR Produkten zu erzielen wurden unterschiedliche MgCl_2 und Taq Polymerase Konzentrationen in einem PCR Ansatz getestet. Die ursprünglich verwendeten Mengen Magnesiumchlorid (MgCl_2) wurden von 2 μl auf 1,5 μl pro Ansatz reduziert und die bisher eingesetzte Menge von 0,125 μl Taq Polymerase auf 0,2 μl pro Ansatz erhöht. Die verwendete cDNA stammt von der Probe J-I d21 12 und als Stichproben wurden die Fraktionen 7, 9, und 15 gewählt, deren Dichte der Tab.11 zu entnehmen ist.

Am Gelbild sind nur PCR Produkte der leichten Fraktion 15 zu erkennen (siehe Abb.8). Es war nicht möglich durch die verwendeten Kombinationen der Polymerase- und der MgCl_2 Konzentrationen PCR Produkte der schweren Fraktionen zu generieren. Einen deutlichen Unterschied kann man jedoch bei der Probe fr15 beobachten. Bei einer Zugabe von 0,125 μl Polymerase und 1,5 μl MgCl_2 ist die Bande am schwächsten ausgeprägt (siehe Abb.8, dritte Bande). Erhöht man bei 0,125 μl Polymerase die MgCl_2 Konzentration auf 2 μl so ist auch eine geringe Steigerung der Intensität der Bande zu verzeichnen. Wird 1,5 μl MgCl_2 aber mit 0,2 μl Taq Polymerase kombiniert, ergibt dies eine noch stärkere Bande. Die Auswirkung der erhöhten Taq Konzentration scheint also deutlich stärker zu sein, als jene Veränderungen der MgCl_2 Konzentrationen. Die stärkste Bande an PCR Produkt wurde erzielt indem die eingesetzten Mengen der Polymerase sowie des MgCl_2 erhöht wurden. Obwohl laut Protokoll des Herstellers die Zugabe von 0,125 μl Taq Polymerase empfohlen wird, erhöht sich die Effizienz der PCR unter Verwendung von 0,2 μl . MgCl_2 lagert sich an Nukleotide und macht sie so zugänglich für die Polymerase. Daher ist es wenig überraschend, eine gesteigerte Polymeraseaktivität zu beobachten, wenn der Co-Faktor MgCl_2 in höherem Maße vorhanden ist.

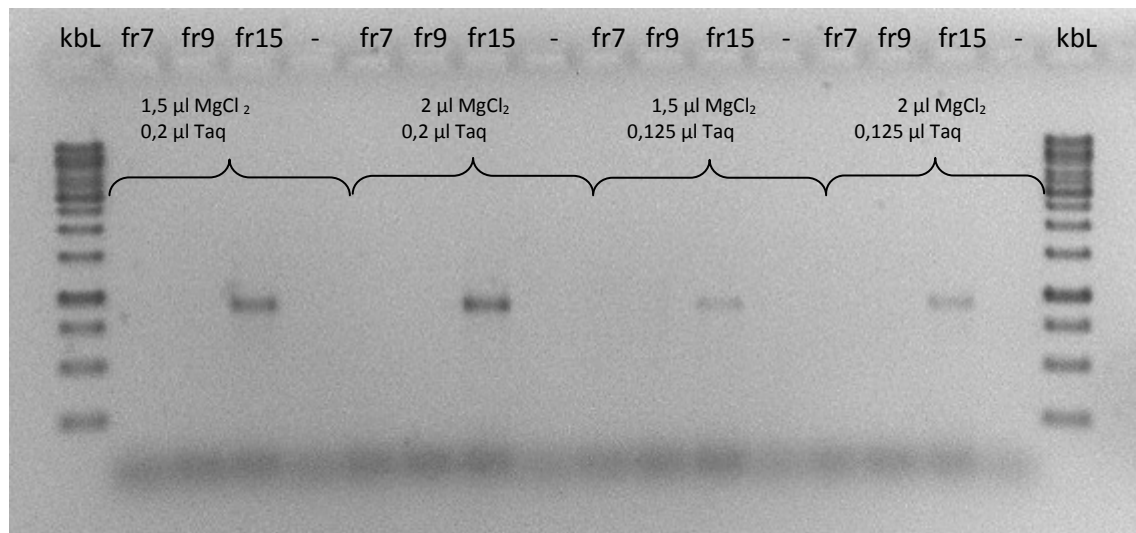


Abb.8: Gelbild der PCR Produkte J-1 d21 12 unter verschiedenen Magnesiumchlorid- (MgCl_2) und Polymerase – Konzentrationen.

Tab.11: Dichte bestimmter Fraktionen des Gradienten J-I d21 12

Fraktion	Dichte [g ml^{-1}]	RNA [ng/Fraktion]
fr7	1,811	2,17
fr9	1,800	2,85
fr15	1,774	14,34

Es wurde unterlassen weitere PCRs zum Austesten der optimalen Konzentrationen von MgCl_2 und Taq Polymerase durchzuführen. Dennoch wurde als Folge dieser Ergebnisse eine erhöhte Menge an MgCl_2 und der Taq Polymerase pro PCR Reaktion eingesetzt.

3.2.3. PCR Zyklenzahl

Die Amplifikation aller Fraktionen eines Gradienten erfolgte in einer PCR Reaktion. Als Positivkontrolle dienten aus Mineralwasser isolierte 16S rRNA Sequenzen in Plasmiden (D1, J1, H35, H2 aus Loy *et al.* 2005). Als Negativkontrolle wurde $\text{MQ}_{\text{bidest}}$ eingesetzt. Ziel der PCR ist es genügend Produkt für eine T-RFLP Analyse zu generieren, die Zahl der Zyklen aber nicht zu hoch zu wählen da Gefahr besteht, bestimmte Sequenzen würden überrepräsentiert (Sipos *et al.* 2007). Auch Nebenprodukte (Qiu *et al.* 2001), Heteroduplexe und einzelsträngige Moleküle (Jensen *et al.* 1993) können durch eine zu hohe Zahl an Zyklen entstehen.

Die Optimierung der Anzahl an PCR-Zyklen wurde an Umweltproben durchgeführt. Getestet wurde eine Fraktion hoher Dichte, sowie zwei Fraktionen geringer Dichte mit 23, 25, 27 und 30 Zyklen per PCR. Die PCR Produkte wurden mittels QIAquick PCR Purification Kit aufgereinigt und in 20 μl MQ_{DEPC} eluiert. 10 μl aller Proben wurden für eine T-RFLP mit MSP I für 3 h verdaut.

Abb.9 zeigt einen Vergleich dreier Fraktionen unterschiedlicher Dichte nach einer PCR mit 23, 25, 27 oder 30 PCR Zyklen. Tabelle XY listet die Anzahl der Peaks über einer Fluoreszenzintensität von zehn auf. Für eine T-RFLP der leichten Fraktionen sind 23 PCR Zyklen ausreichend um die Diversität der

Probe zu erkennen. In der schweren Fraktion mit der Dichte $1,817 \text{ g ml}^{-1}$ ist nach 23 PCR Zyklen nur ein Peak erkennbar (siehe Tab.13). In selber Fraktion wurden nach 25 PCR Zyklen vier Peaks gemessen. Auch in den leichteren Fraktionen erhöht sich die Zahl der Peaks von 12 auf 25 in Dichtefraktion $1,793 \text{ g ml}^{-1}$ und von 16 auf 28 Peaks in der Fraktion der Dichte $1,774 \text{ g ml}^{-1}$ nach zwei zusätzlichen PCR Zyklen. Bei Versuchen mit 27 PCR Zyklen wurde zwar die Intensität der Peaks nochmals gesteigert die Zahl der Peaks über den Schwellenwert von 10 Fluoreszenzeinheiten verringerte sich ausgenommen der Fraktion mit höchster Dichte aber. Ein großer Unterschied in der Anzahl der Peaks über dem Schwellenwert konnte nach einer PCR mit 30 Zyklen festgestellt werden. Die Zahl der Peaks erhöhte sich in der leichten Fraktion von 24 auf 35 Peaks und vervierfachtete sich in der schweren Fraktion. Da während einer PCR gewisse Sequenzen öfter amplifiziert werden als andere, kommt es zu einer Überrepräsentation einzelner Peaks (Sipos *et al.* 2007). Um diesen Umstand möglichst einzudämmen wurde eine PCR mit 25 Zyklen gewählt.

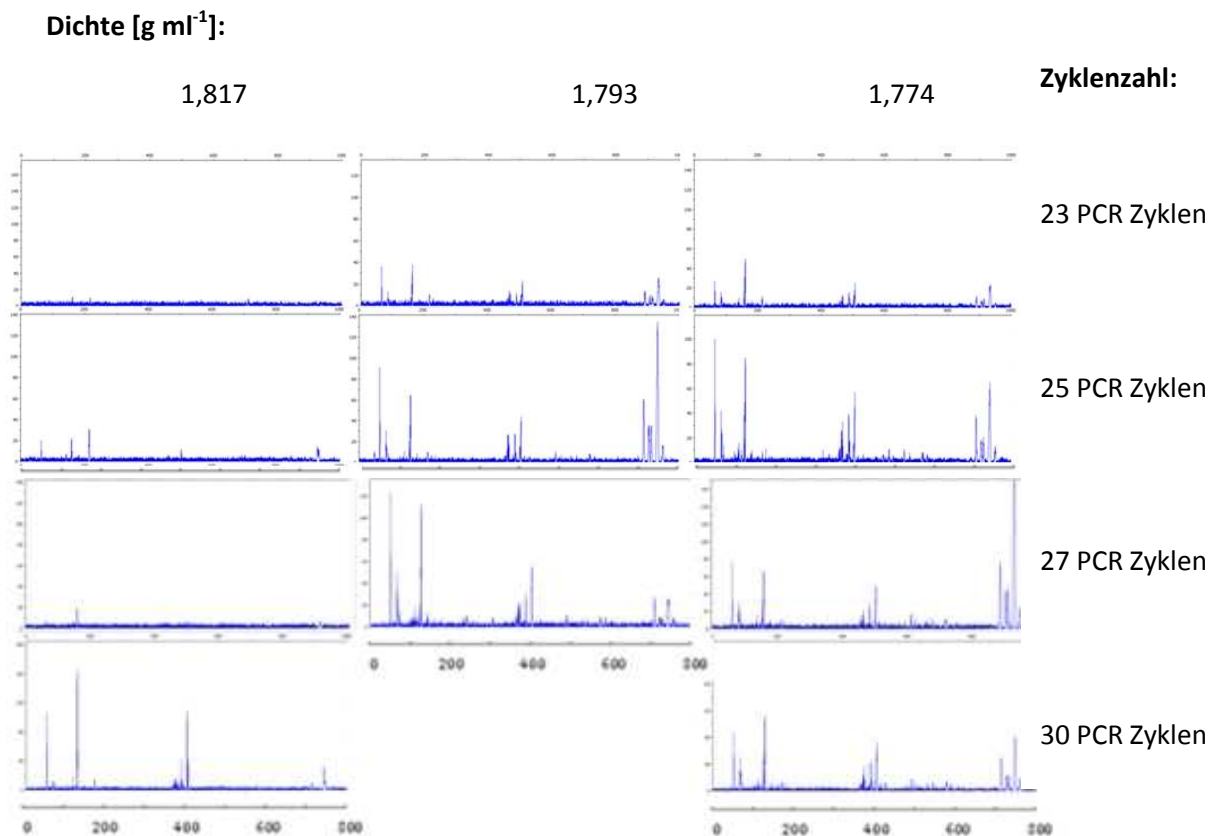


Abb.9: Ein Vergleich unterschiedlicher Restriktionsfragmente nach 23, 25, 27 und 30 PCR Zyklen. Durch einen Pipettierfehler während der T-RFLP Analyse konnte die Fraktion der Dichte $1,793 \text{ g ml}^{-1}$ nicht analysiert werden.

Tab.12: Tabelle beinhaltet Anzahl der Peaks über einer Fluoreszenzintensität >10

Dichte [g ml ⁻¹]				
1,817	1,793	1,774		
1	12	16	23	PCR Zyklen
4	25	28	25	
4	23	24	27	
16		35	30	

Aus diesen Ergebnissen schließend, wurde der Dichte-Gradient der Probe von Station J, Tag 21 (¹³C-Azetat) mit 25 PCR Zyklen amplifiziert.

Da bei den Proben mit 25 PCR Zyklen, teilweise unverdaute PCR Amplifikate festgestellt wurden, musste die Dauer des enzymatischen Verdaus neu ermittelt werden. Ist der Einsatz des Restriktionsenzymes zu kurz bleiben ungeschnittene PCR Produkte in der Probe. Ist die Dauer des Verdaus zu lang, könnten Sequenzen degradiert werden. Daher wurde der Einsatz von MSP I für 1 h, 3 h, 8 h und 16 h an vier unterschiedlichen Sequenzen in Plasmidinserts getestet. Die Ergebnisse der Studie sind sehr ähnlich (siehe Abb.10). Das Auftreten von ungeschnittenen Sequenzen ist kaum zu beobachten. Die Höhe der Peaks nach nur einer Stunde Restriktionsverdaus ist sehr gering.

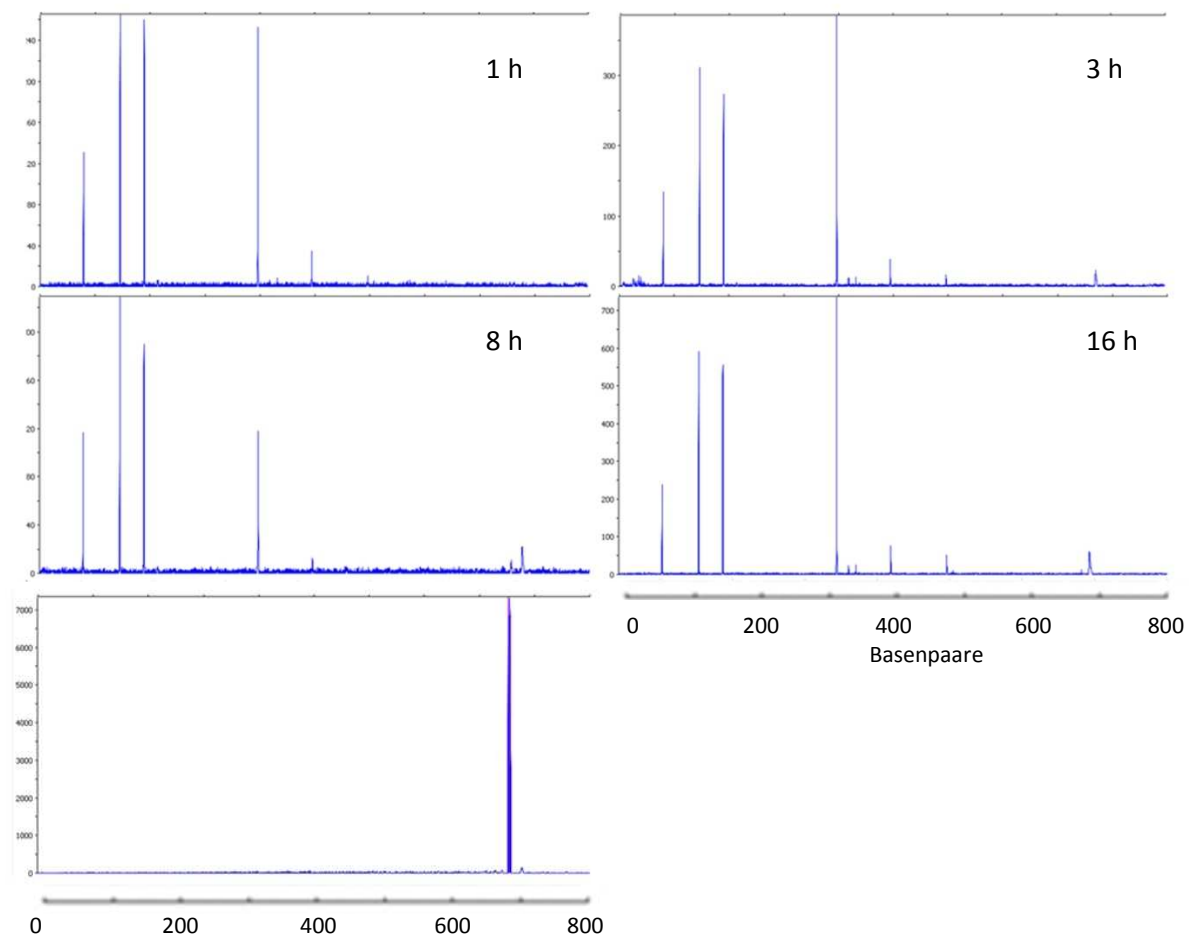


Abb.10: T-RFLPs einer Mischung aus vier unterschiedlichen Sequenzen nach 1, 3, 8 und 16 h Restriktionsdauer. Links unten ist eine ungeschnittene Probe, daher ohne den Einsatz eines Restriktionsenzymes zu sehen.

3.3. Metabolischer Aktivitätsnachweis durch Messung der Sulfatreduktionsraten in den Inkubationen

Die Ermittlung der Sulfatreduktionsraten erfolgte von Julia Rosa de Rezende¹ an der Universität Aarhus in Dänemark und die erhobenen Daten wurden freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Von gemessenen Sulfatreduktionsraten der drei Replikate gleicher Substratzugabe wurden die Mittelwerte berechnet und miteinander verglichen. Über den gesamten Zeitraum der Inkubation relativ konstant war die SRR der Proben mit ¹³C Azetatzugabe zwischen 15 und 23 nmol cm⁻³ d⁻¹ (siehe Abb.11 bzw. Anhang Tab.A1). Auf ähnlichem Niveau befinden sich die gemessenen Werte der ¹²C Azetat Proben, jedoch unterliegt die Rate in den ersten vier Tagen wesentlich stärkeren Schwankungen, auch die Standardabweichung am zweiten Tag der Inkubation ist sehr hoch. Die unbehandelten Proben wiesen eine Reduktionsrate rund 10 - 15 nmol cm⁻³ d⁻¹ und einen Mittelwert von 11 nmol cm⁻³ d⁻¹ auf. SRM fanden in den Sedimenten auch ohne hinzugefügtes Azetat genügend Substrat vor um während der Inkubation metabolisch aktiv zu sein. Im Gegensatz dazu wurde die Sulfatreduktionsrate der Probe mit Molybdat einem Mittelwert von 0.32 nmol cm⁻³ d⁻¹ fast gänzlich inhibiert.

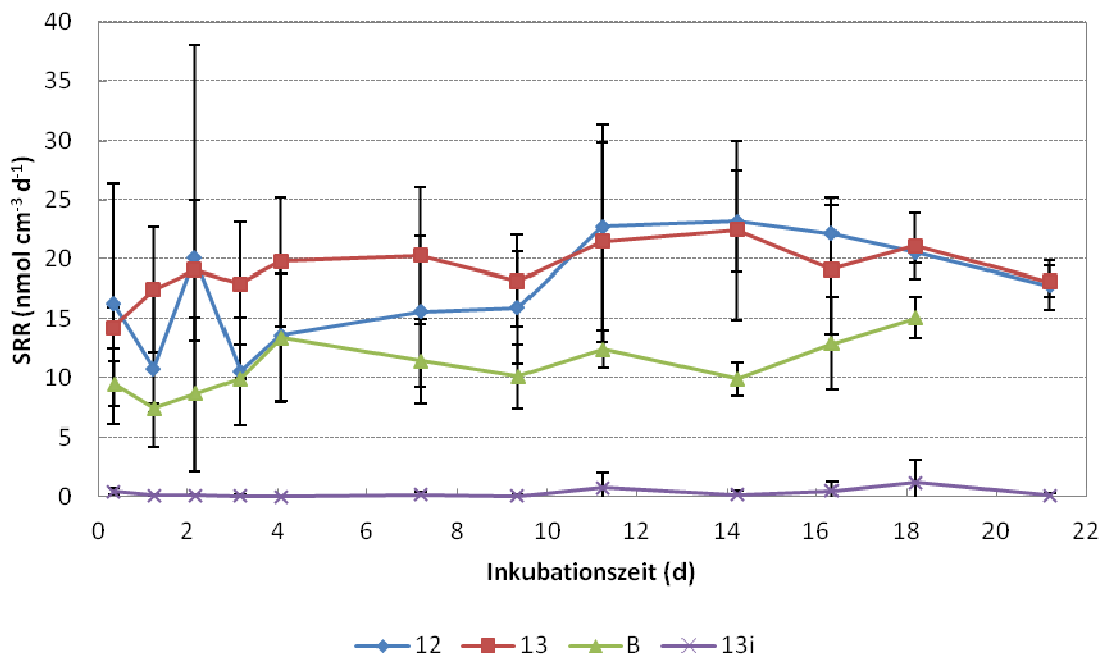


Abb.11: Sulfatreduktionsraten der Inkubationen mit ¹³C markierten Acetat (12; blau) und ¹²C markiertem Acetat (13; rot), der inhibierten Probe (13i; lila) und der Kontrollprobe ohne zugegebenes Azetat (B; grün). Jeweils drei entsprechende Inkubationen wurden gemittelt. Die Fehler zeigen die Standardabweichung an.

¹ Zentrum für Geomikrobiologie, Department of Biological Sciences, Aarhus University, Ny Munkegade, DK-8000 Aarhus, Dänemark.

3.4. RNA Isolierung

Nach Anwendung des modifizierten RNA Isolierungsprotokolls nach Lüders (2004) und einer TRIzol® Reextraktion wurde die RNA am Spektrophotometer vermessen. In Tab.13 sind die gemessenen Werte der Proben aus Station J (Replikate I und II) vom 18. und 21. Tag der Inkubation (d18 bzw. d21) angegeben. Die RNA Konzentrationen der Umweltproben aus Station J schwanken bei einem Gesamtvolumen von 30 µl zwischen 17,87 und 68,7 ng/µl (siehe Tab.13). Die Isolate aus Station AH schwanken zwischen einem Höchstwert von 98,1 ng/µl und 24,7 ng/µl. Die Werte von 260/230 nm liegen bei den Umweltproben knapp über null. Es sind daher zwar Ethanolverunreinigungen der RNA vorhanden, welche eine hohe Absorption bei 230 nm aufweisen, aber die Kurven der Absorptionsrate zeigen einen deutlichen, für Nukleinsäuren charakteristischen Peak bei 260 nm (siehe Abb.12). Bei einer RNA Isolierung aus einer bakteriellen Reinkultur ist die Ausbeute an RNA wesentlich höher als aus Umweltproben. Die Dichte der Zellen des *E.coli* Stammes zum Zeitpunkt der Isolation wurde zwar nicht ermittelt, es ist aber anzunehmen, dass die Dichte der Zellen in Sedimentproben von durchschnittlich $3,87 \times 10^9 \text{ ml}^{-1}$ (Ravenschlag *et al.* 2000) übertroffen wird. Viele dieser Zellen sind im Gegensatz zu exponentiell wachsenden Reinkultur metabolisch inaktiv, was sich auf den RNA Gehalt der Proben auswirkt. Als weitere Ungleichheit zwischen den Umweltproben und den Reinkulturen beinhaltet das Medium um *E.coli* zu kultivieren keine Huminsäuren und andere Stoffe, welche eine effiziente RNA Isolation verhindern.

Die Kontrolle der RNA auf Rückstände von DNA über eine PCR mit 30 Zyklen und universellen bakteriellen Primer ergab in keinem Fall ein Produkt (siehe Anhang Abb.A2).

Tab.13: Konzentrationsmessung der RNA aus isolierten Proben Station J, Tag 0, 11, 14 18 und 21, Station AH-I, Tag 0, 5 und 10 sowie *E.coli* Kulturen

Probe	Volumen	Konzentration [ng/µl]	260/280	260/230
J-I d0	30 µl	21,0	1,46	0,27
J-I d11 ¹³ C	30 µl	34,67	1,92	0,85
J-I d14 ¹³ C	30 µl	68,1	1,78	1,16
J-I d18 ¹³ C	30 µl	26,32	1,69	0,23
J-I d18 ¹² C	30 µl	29,07	1,76	0,28
J-I d21 ¹³ C	30 µl	17,87	2,01	0,27
J-I d21 ¹² C	30 µl	12,56	1,76	0,31
J-II d21 ¹³ C	30 µl	68,70	1,62	0,20
J-II d21 ¹² C	30 µl	37,57	1,67	0,33
AH-I d0	30 µl	98,1	1,23	0,78
AH-I d5	30 µl	24,7	1,45	0,65
AH-I d10	30 µl	27,7	1,43	0,68

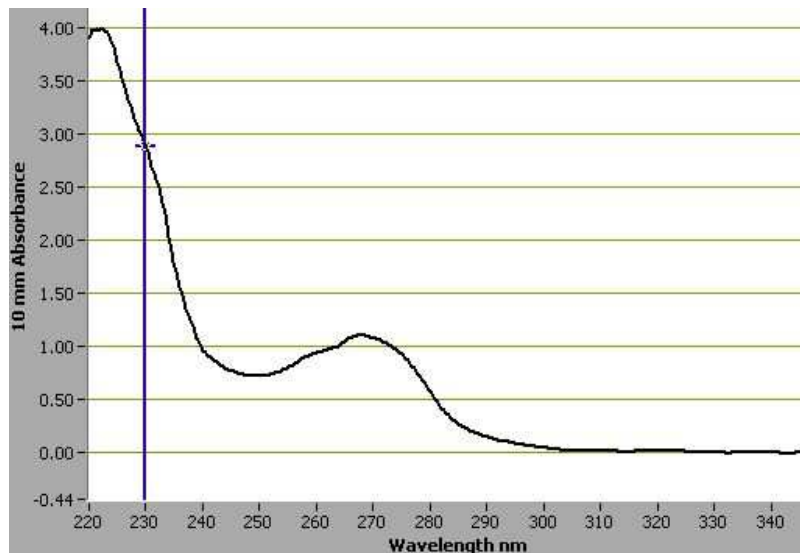


Abb.12: Exemplarische Darstellung der Absorptionsrate der isolierten RNA aus der Probe J-II Tag 21. inkubiert mit ^{12}C -Azetat ermittelt durch ein NanoDrop ND-1000 Spektrophotometer.

3.5. Anreicherung an ^{13}C -Atomen in RNA Proben

Eine Häufung von ^{13}C Atomen in RNA Proben über den Zeitraum der Inkubation sollte einerseits über Massenspektrometrie sowie eine höhere Dichte der RNA festgestellt werden. Margarete Watzka² ermittelte die isotopische Zusammensetzung von RNA Proben aus Station J von Tag 18 sowie 21 der Inkubation, da an späten Zeitpunkten die höchste Markierung erwartet wird.

Tab.14: Verhältnis der ^{13}C zu ^{12}C Isotope und relativer Anteil an ^{13}C Atomen in RNA Isolaten aus Umweltproben nach 18 und 21 Tagen Inkubation

RNA Probe	$\delta^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$	^{13}C [%]
d18 12	-24,8273	1,0785
d18 13	-5,8296	1,0993
d21 12	-19,3532	1,0845
d21 13	-2,4751	1,1030

Zum Vergleich wurde jeweils ^{12}C und ^{13}C RNA gemessen. Berechnet wird danach das Verhältnis von ^{13}C zu ^{12}C Atomen. Die RNA Probe Station J d18 zeigt einen Unterschied zwischen ^{12}C und ^{13}C von -24,8 zu -5,8 was auf einen geringfügigen Einbau von ^{13}C Atomen hindeutet (siehe Tab.14). Bei den Proben d21 12 und 13 liegt die Differenz bei -19,4 zu -2,5. Man kann angesichts dieser Werte allerdings nicht von einer starken Markierung sprechen. Die Probe d21 13 besteht zu rund 1,1% aus schweren ^{13}C Atomen, die unmarkierte RNA aus Probe d21 12 aus rund 1,08%. Dieser Unterschied von nur 0,02% ist verschwindend gering und aufgrund einer einzelnen Messung nicht aussagekräftig.

² Department für chemische Ökologie und Ökosystemforschung, Universität Wien

3.6. Quantitative PCR

Die Ergebnisse der quantitativen PCR ergaben am ersten Tag der Inkubation einen erwarteten Peak der RNA in den leichten Fraktionen von einer Dichte rund um $1,76\text{--}1,79\text{ g ml}^{-1}$ (siehe Abb.13). Die Y-Achse beschreibt die errechneten Genkopien der 16S rRNA pro Fraktion. Die Kurve zeigt die Mittelwerte der in Duplikaten durchgeführte qPCR.

Im Verlauf der Inkubation wurde ein Nachweis der RNA in den Fraktionen unmöglich. Bei den Proben aus Station AH sank die Gesamtzahl der Genkopien am 10. Tag der Inkubation auf einen Bruchteil der Genkopien früherer Probenstage. Ebenso konnte bei Quantifizierung der Proben von Station J zum Zeitpunkt null im Bereich $1,77\text{ g ml}^{-1}$ bis zu $1,46 \times 10^8$ Genkopien gemessen werden (siehe Abb. 14). Der Nachweis von RNA in Fraktionen der Zentrifugation von Tag 14 konnten nicht erbracht werden. Selbst in leichten Fraktionen konnte kaum RNA transkribiert und amplifiziert werden. Die Produkte der real-time PCR wurden mit einer Schmelzkurvenanalyse untersucht (siehe Anhang Abb. A3). Dabei wurden keine Primer-Dimere, welche als Peaks unter 72°C auftreten, festgestellt. Die PCR Produkte wurden anschließend auf ein Agarose-Gel geladen, wobei in den Umweltproben trotz 40 PCR Zyklen keine Banden erkennbar waren.

Die Gründe weshalb im Laufe der Inkubation keine qPCR durchgeführt werden konnte sind nicht bekannt. Ein Vergleich der Absorptionswerte der RNA Proben nach der Isolation zeigt keine Unterschiede. Um sicherzugehen ein Degradieren der RNA während der Lagerung zu vermeiden wurden die Proben neu zentrifugiert. Doch trotz einer wiederholten reversen Transkription und qPCR der Probe J-I d14 13 konnte kein anderes Ergebnis erzielt werden (siehe Abb.14). Es ist daher unabdingbar eine weitere Quantifizierungsmethode anzuwenden.

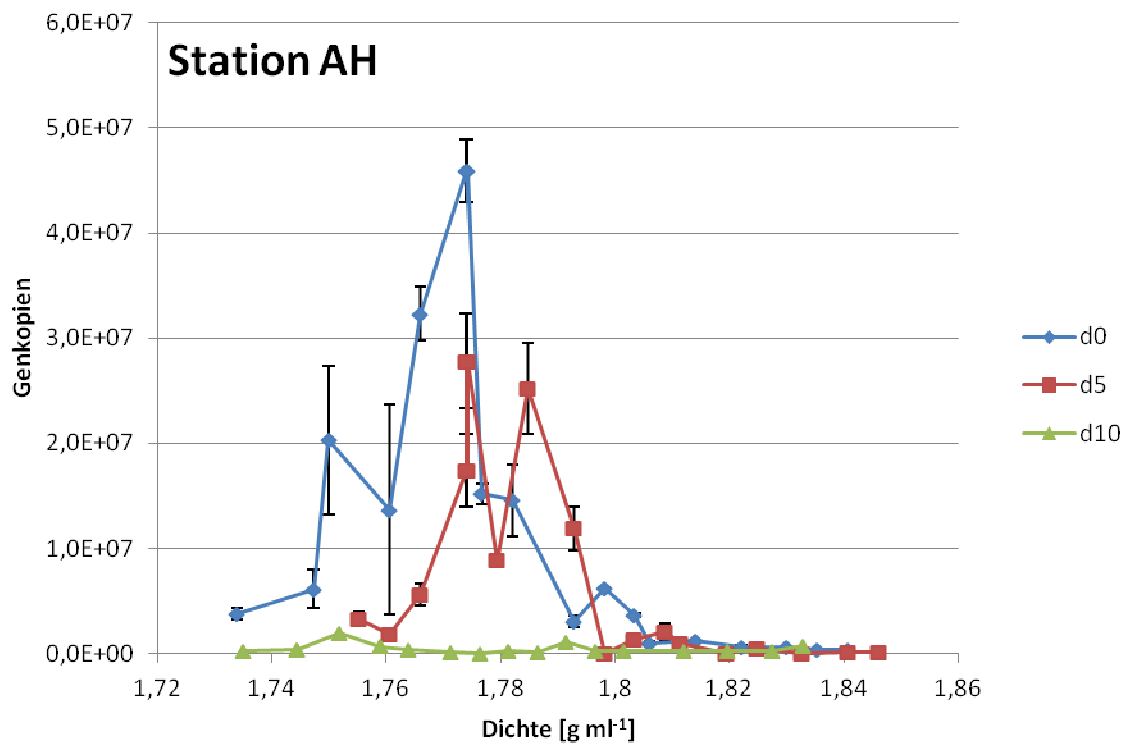


Abb.13: Anzahl der 16S rRNA Gen Kopien, ermittelt durch q-PCR drei verschiedener RNA Zentrifugationen zu unterschiedlichen Zeitpunkten von Station AH

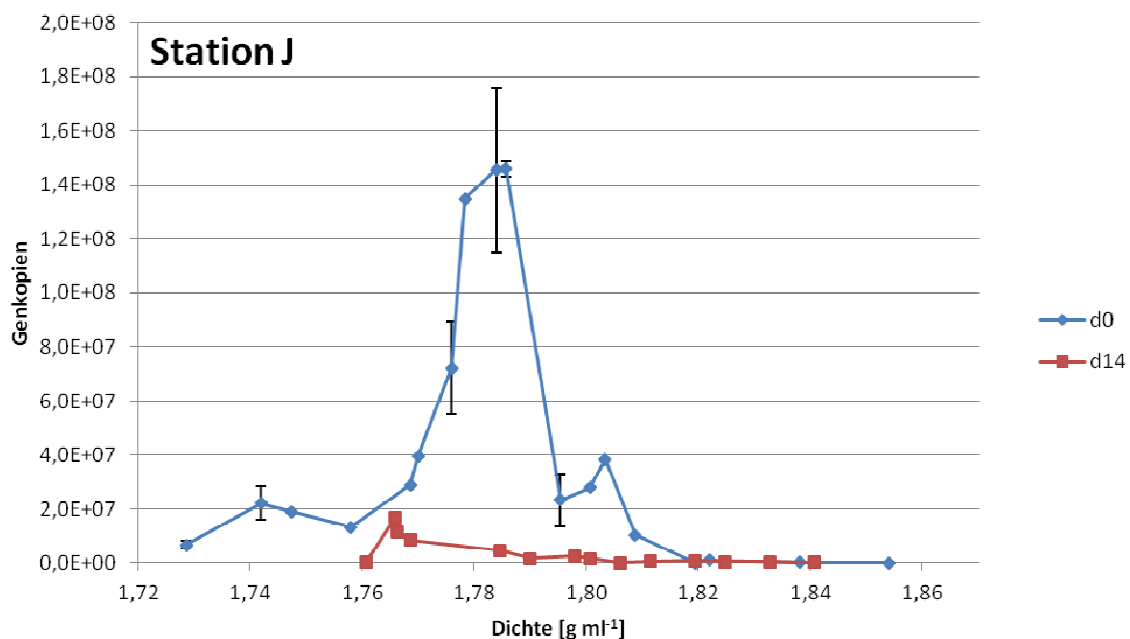


Abb.14: Anzahl der 16S rRNA Genkopien zweier RNA Dichtegradienten zu Beginn und nach zwei Wochen der Inkubation. Die Fehlerindikatoren geben die Standardabweichung der in Triplikaten durchgeführten Proben an.

Um die Verteilung der RNA über die Dichtegradienten nach der Zentrifugation zu verfolgen, wurde der RNA Gehalt der einzelnen Fraktionen mittels Ribogreen® ermittelt. RNA vom 11. Tag der Inkubation verteilt sich sehr stark in den leichteren Fraktionen in denen die Konzentration bei 2- 12 ng RNA pro Fraktion liegt (siehe Abb.15 A). Ab einer Dichte von 1,79 ist RNA in den einzelnen Fraktionen kaum nachweisbar. Es kann daher angenommen werden, dass bis zum geprüften Zeitpunkt keine zu erkennende Markierung der RNA stattgefunden hat.

Die Messung der RNA vom 18. Tag der Inkubation im Gradienten weist ein anderes Bild auf. Der Großteil der RNA ist bei einer Bouyant Dichte von 1,78 messbar (siehe Abb.15 B). Im starken Gegensatz zum Gradienten vom 11. Tag sind auch bei einer Dichte von 1,8 über 6 ng als auch bei einer Dichte von 1,82 über 2 ng RNA pro Fraktion nachgewiesen.

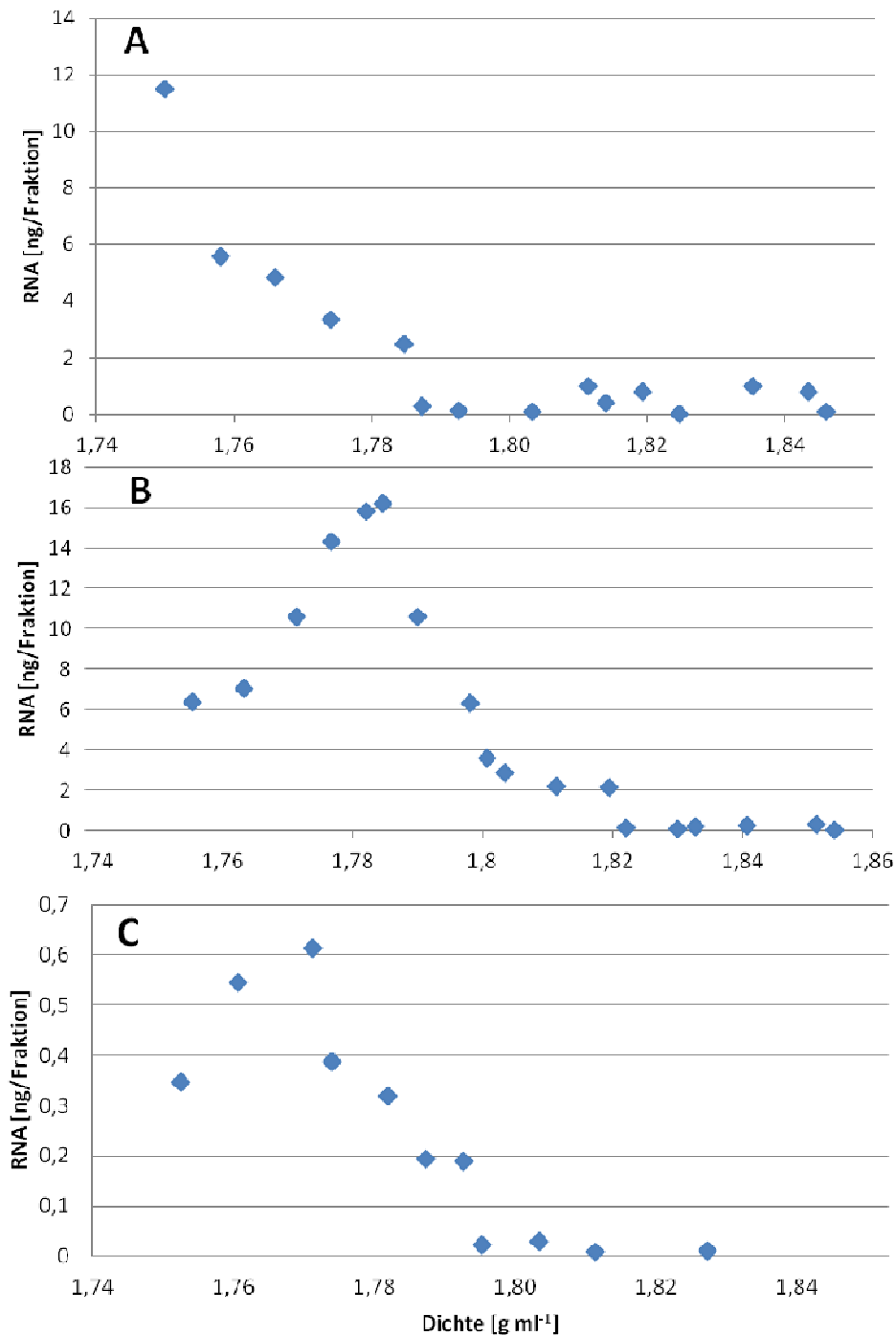


Abb.15: Ein Vergleich der Verteilung der RNA in den Dichtegradienten. A beinhaltet RNA aus dem 11. Tag der ¹³C-Azetat Inkubation, B stellt die RNA im Gradienten vom 18. Tag der Inkubation dar. Der gesamt gemessene RNA Gehalt ist im Gradienten vom 21. Tag ist wesentlich geringer als in den Zentrifugationen der RNA vom 11. und 18. Tag.

Nach Zentrifugation der inkubierten Umweltprobe vom 21. Tag der Inkubation konnte der Bulk der RNA in einem Dichtebereich von 1,78 bis 1,75 gemessen werden (siehe Abb.15 C). Bei der Fraktion der Dichte 1,795 g cm⁻³ ist der berechnete RNA Gehalt knapp über 0 ng. Teilweise sind die berechneten Werte der schweren Fraktionen negativ, welches durch Pipettierfehler der Standardkurve zustande kam. Auffällig ist, dass die Gesamtmenge an RNA im Gradienten zu einem späteren Zeitpunkt der Inkubation signifikant geringer ist. Derartige Ergebnisse wurden auch bei durchgeführten qPCR Studien erhalten (siehe Abschnitt 3.6).

Insgesamt konnte im fraktionierten Gradienten vom 21. Tag der Inkubation keine deutliche Markierung von ¹³C RNA durch die Quantifizierung der RNA in den unterschiedlichen Dichtefraktionen nachgewiesen werden. Ein Vergleich der Verteilung der RNA von Tag 11 und Tag 18 lässt jedoch eventuell auf eine Verschiebung der RNA in Richtung schwere Fraktion schließen.

Nach einer reversen Transkription des Gradienten der ¹³C-RNA Probe von Tag 21 der Inkubation aus Station J wurde eine PCR durchgeführt. Anschließend 5 µl der PCR Produkte auf einem Agarosegel visualisiert (siehe Abb.16), um zu bestätigen, genug PCR Produkt für eine T-RFLP Studie synthetisiert zu haben. Mit Ausnahme der Fraktion mit Dichte 1,857 g ml⁻¹ und der Negativkontrolle konnten in allen Fraktionen Banden erkannt werden. Reichlich PCR Produkt konnte in den Fraktionen mit einer Dichte von 1,795 bis 1,678 g cm⁻³ nachgewiesen werden. Da auf dem Gel sehr große Mengen an Primern nachweisbar sind, ist eine Aufreinigung der Proben unerlässlich.

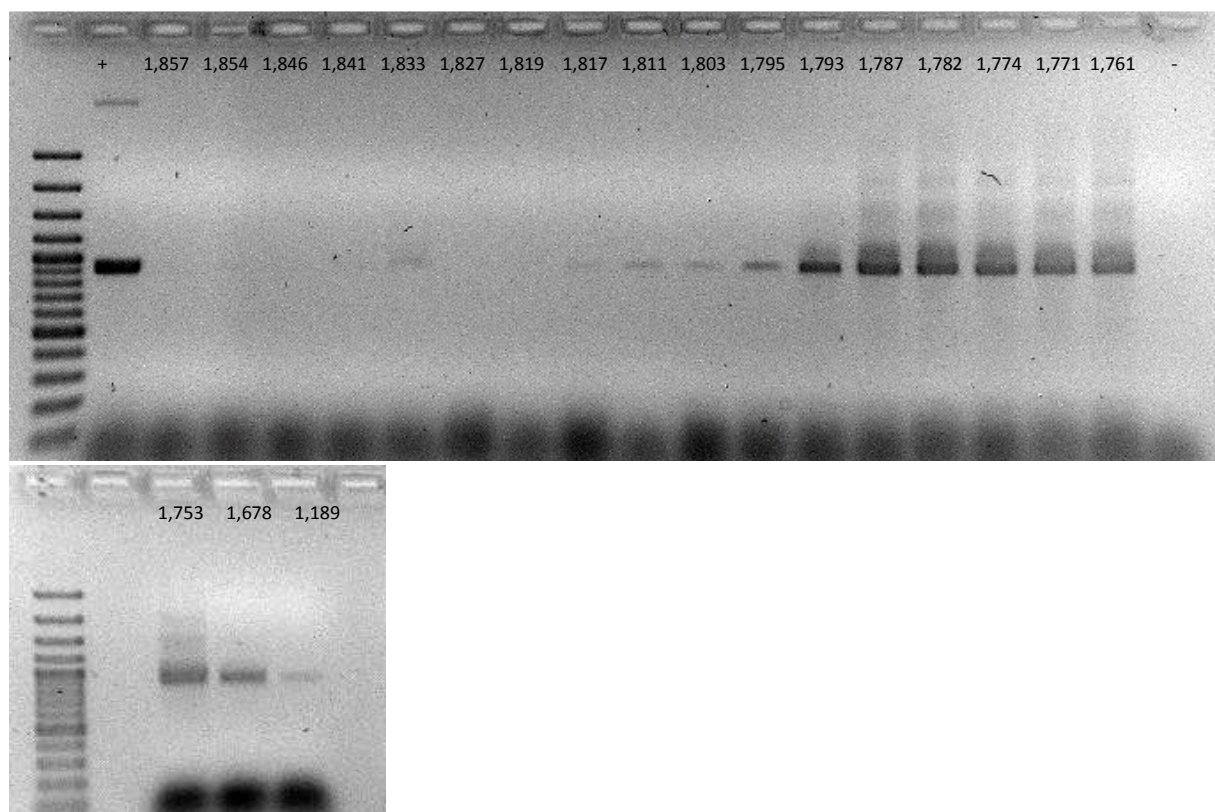


Abb.16: PCR Produkte der zwanzig Fraktionen des Gradienten Station J, d21 ¹³C-Azetat. Am Beginn die Positiv-, am Ende der ersten Reihe die Negativkontrolle.

3.7. T-RFLP

Das T-RFLP Profil des Dichtegradienten der RNA der Inkubation J, Tag 21 wies keine ungeschnittenen PCR Produkte auf. Insgesamt war die Intensität der Peaks schwach, aber die Grundlinie sehr flach ohne viel ‚Hintergrundrauschen‘ (Abb.17).

Haben Zellen während der Inkubation ^{13}C markiertes Azetat aufgenommen und die Kohlenstoffisotope daraus in RNA eingebaut, sind diese Organismen in den schweren Fraktionen der Zentrifugation nachzuweisen. In Fraktionen geringer Dichte ist sehr hohe Diversität der mikrobiellen Gemeinschaft zu erwarten. In schweren Fraktionen werden nur spezifisch markierte Bakterien in Form von Peaks, deren Intensität bei abnehmender Dichte des Gradienten ebenfalls abnimmt, gesucht.

Betrachtet man das gesamte T-RFLP Profil (Abb.17) erhöht sich die Zahl der aufgezeichneten TRFs mit sinkender Dichte der Fraktion. Die Anzahl, Intensität und Verteilung der Peaks ist in den leichten Fraktionen sehr ähnlich. Ein Vergleich mit den Ergebnissen der RiboGreen® Messung zeigt, dass ab jener Dichte, der RNA Gehalt in den leichteren Fraktionen deutlich höher liegt.

Zum Vergleich der Fraktionen wurden Peaks mit einer relativen Fluoreszenzintensität von mindestens 25 herangezogen. Die Zahl der Peaks bleibt in hoher Dichte bis 1,811 zwischen 3 und 6 Peaks pro Fraktion. Nach einer Analyse von Whiteley (2007) und der Zentrifugationsstudien mit *E.coli* (siehe Abschnitt 3.1) ist gänzlich unmarkierte ^{12}C -RNA in einem Dichtebereich von 1,75-1,77 g ml^{-1} nicht aber bei 1,8 g ml^{-1} nachzuweisen. Handelt es sich bei den Peaks nicht um Artefakte, könnte es sich um 16S rRNA Sequenzen sulfatreduzierender Bakterien handeln welche ^{13}C -Azetat aufgenommen haben.

Tab.15: Gemessene Anzahl von Peaks mit einer Intensität mindestens 25 Fluoreszenzeinheiten. Ab einer Dichte von 1,803 g ml^{-1} steigt die Zahl der gemessenen Peaks sprunghaft an.

Anzahl der Peaks		Anzahl der Peaks	
Dichte [g ml^{-1}]	[>25 RFU]	Dichte [g ml^{-1}]	[>25 RFU]
1,857	4	1,795	27
1,854	5	1,793	47
1,846	4	1,787	59
1,841	4	1,782	49
1,833	5	1,774	55
1,827	6	1,771	52
1,819	3	1,761	74
1,817	6	1,753	60
1,811	3	1,678	37
1,803	14	1,189	15

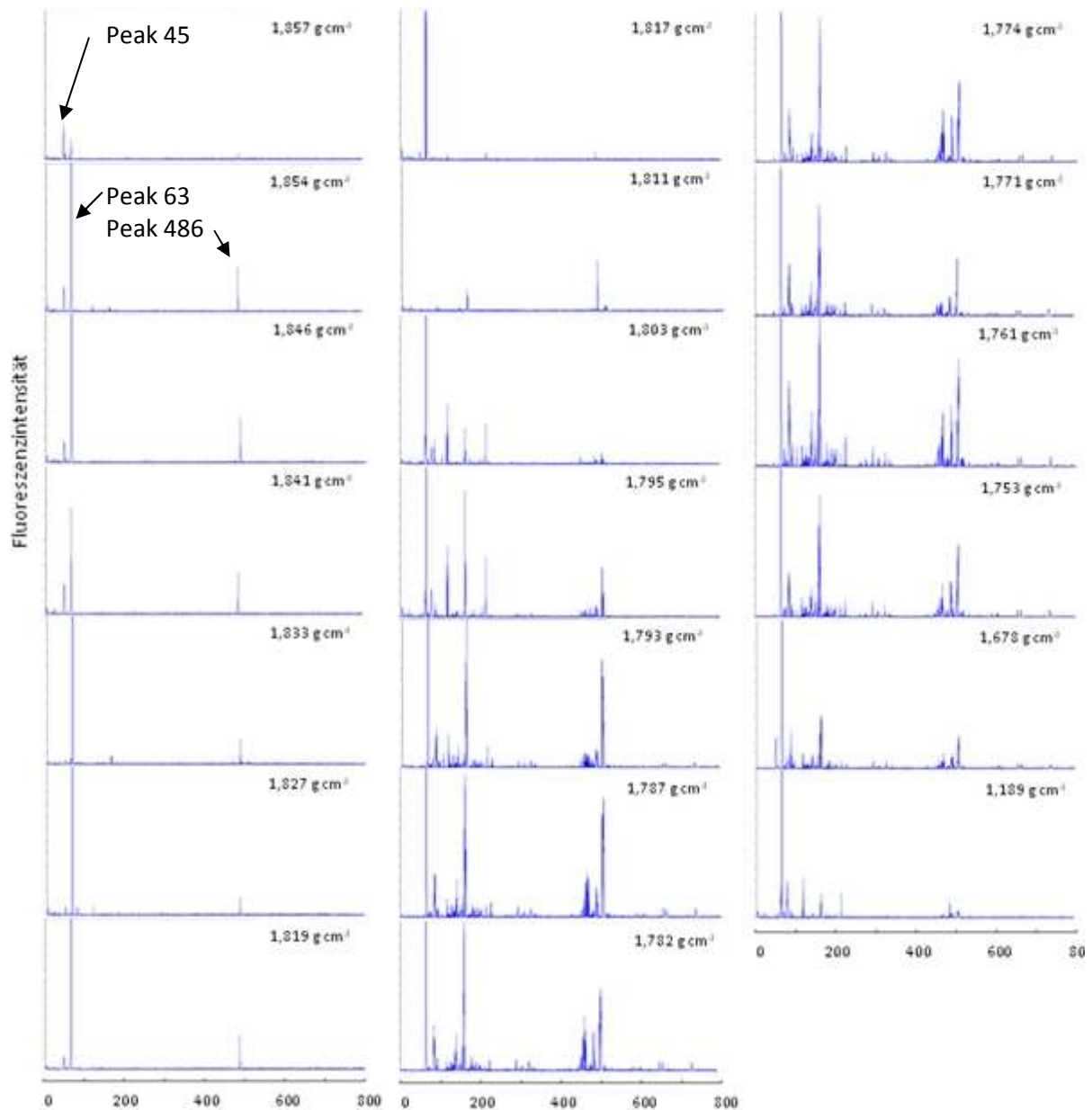


Abb.17: T-RFLP Profil der zwanzig Fraktionen der Probe Station J d21 ¹³C. Die Y- Achse wurde auf 900 Fluoreszenzeinheiten und die X – Achse auf 0 – 800 bp genormt.

Im T-RFLP Profil sticht Peak 63 ins Auge, welcher in allen zwanzig Fraktionen vorkommt und meist ein Vielfaches der Intensität anderer Peaks aufweist weshalb der Verdacht besteht, es könnte sich um keinen echten Peak handeln. Es könnte auch sein, dass es sich bei Peak 63 um eine sehr abundante Bakterienart handelt, welche stark markiert wurde. Der Peak könnte eine oder gar mehrere unterschiedliche Sequenzen mit einer Länge von 63 bp beinhalten, welche über den gesamten Dichtegradienten vorhanden sind. In dieser Studie konnte keine Information erhalten werden, ob und wie viele Sequenzen sich hinter Peak 63 verbergen da eine Vielzahl an Organismen zufällig über eine MSP I Schnittstelle an derselben Stelle der Sequenz verfügen könnten.

Zwei weitere Peaks bei 45 bp und 486 bp, sind bei einer Bouyant-Dichte von 1,86 bis in die leichten Fraktionen nachweisbar sind. Die Flächen unterhalb der Peaks sind im Anhang in Tab.A2 angegeben. Die Intensität der Peaks ist ein Bruchteil des Peaks 63. Peak 45 ist mit einer Ausnahme in 6 von 7 schweren Fraktionen nachweisbar und hat sein Maximum im Dichtebereich von 1,86-1,84 (siehe Abb.18). In den mittelschweren Fraktionen sinkt die Intensität des Peaks auf nahezu null und steigt in den leichten Fraktionen wiederum leicht an. Einen sehr ähnlichen Verlauf zeigt Peak 468 dessen Maximum an Intensität ebenfalls in den Dichtebereich der ^{13}C RNA fällt (siehe Abb.18). Mit dem Verschwinden des Peaks 486, erreicht in den leichteren Fraktionen ein anderer Peak welcher bei einer Länge von 487 bp liegt, zunehmend Intensität. Auch bei Replikaten von T-RFLP Profilen mit 2 μl eingesetzter Probe, erscheint der selbe Peak bei exakt 486 bp in schweren Fraktionen und bei 487 bp ab einer Dichte von 1,795. Sollte der Peak bei 486 bp auch in den leichteren Fraktionen vorhanden sein, wird er vom größeren Peak bei 487 bp überschattet.

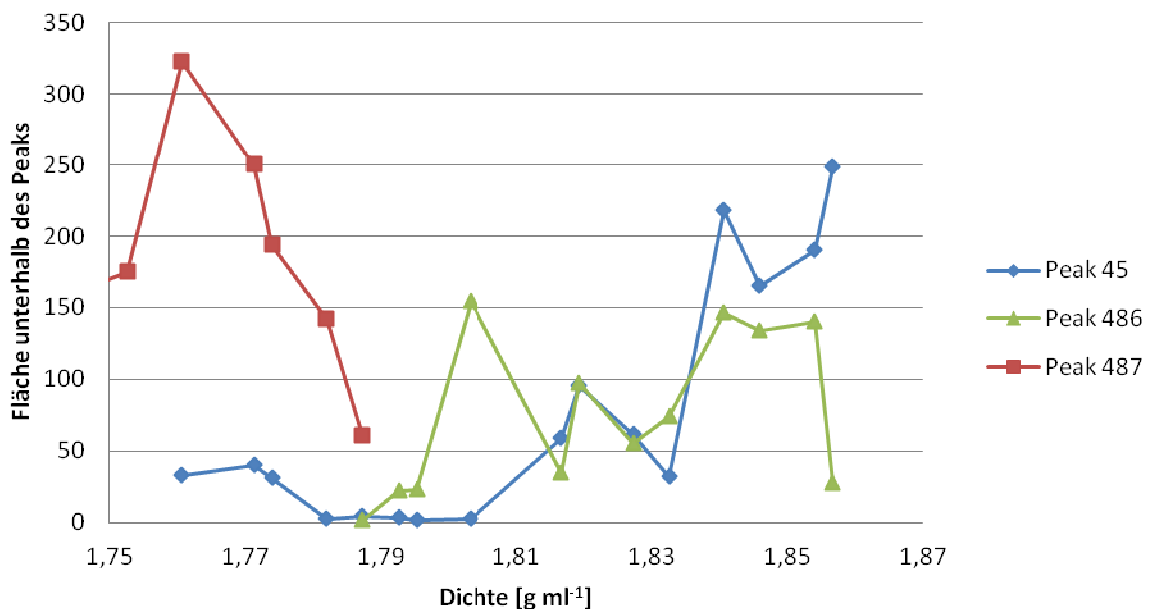


Abb.18: Abbildungen stellen den Intensitätsverlauf drei verschiedener Peaks über den Dichtegradienten dar. Peak 45 (blau) gewinnt mit zunehmender Dichte an Intensität. Peak 486 tritt nur in Fraktionen relativ hoher Dichte auf. Im Bereich geringer Dichte des Gradienten ist stattdessen Peak 487 deutlich nachweisbar.

Da zwischen den Peaks der schweren und der leichten Fraktion jeweils nur ein Basenpaar Unterschied herrscht, könnte es sich auch um Messfehler des Sequenzierers handeln. Auffallend ist jedoch, dass das Maximum des Peaks in allen Fraktionen von 1,795 bis 1,855 bei 486 bp liegt. Dies trifft auf die Messungen mit 4 μl sowie mit 2 μl eingesetzter Probe zu. In allen leichteren Fraktionen hat der Peak sein Maximum bei 487 bp. Dies ist unabhängig von der Größe der Fläche unterhalb des Peaks.

Die Überprüfung einer mit ^{12}C -Azetat inkubierten Probe oder das Klonieren und Sequenzieren der PCR Produkte aus den Fraktionen über einer Dichte von $1,8 \text{ g ml}^{-1}$ geben Aufschluss über die Identität der Bakterien, welche für beschriebene Peaks verantwortlich sind.

In einer Publikation von Hubert *et al.* (2010) wurden Sequenzen aus Sedimentproben von Station J veröffentlicht. An diesen Sequenzen wurden die MSP I Schnittstellen der 16S rRNA gesucht und virtuell getrennt. Abb.19 stellt einen Vergleich der virtuell geschnittenen Daten und des T-RFLP Profils einer leichten Fraktion des Dichtegradienten dar. Jede in silico verdaute Sequenz wird ihrer Länge nach aufgezeichnet. Die y-Achse der künstlichen T-RFs beschreibt die Anzahl der Sequenzen gleicher Länge.

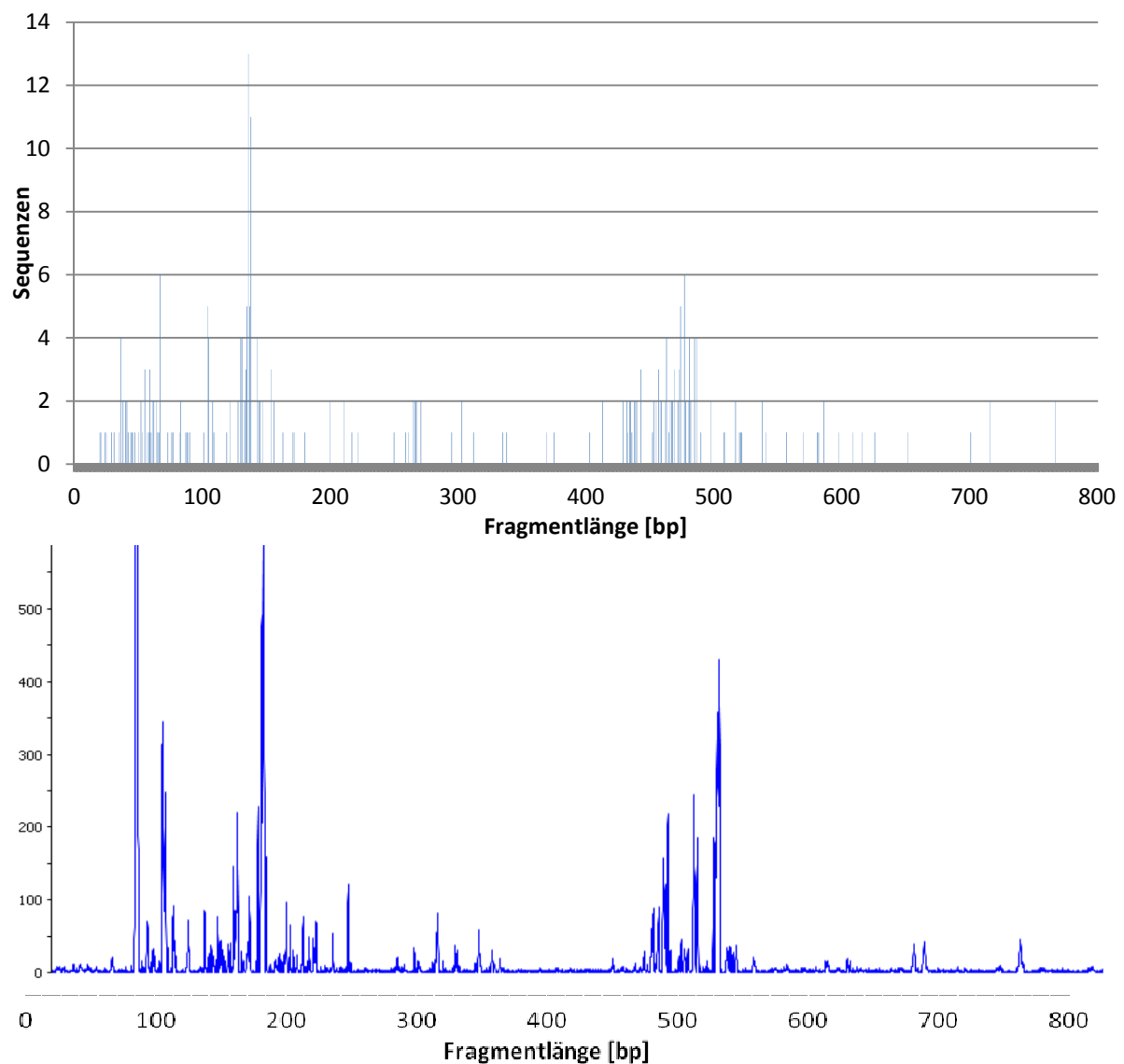


Abb.19: Vergleich der mit Azetat inkubierten Probe einer Fraktion der Dichte $1,762 \text{ g ml}^{-1}$ und in silico geschnittenen Sequenzen aus uninkubierten Proben aus Station J (Hubert *et al.* 2010).

Die in silico durchgeführten T-RFLP und die T-RFs der Fraktion mit einer Bouyant Dichte von $1,762 \text{ g cm}^{-3}$ h ähneln sich zwar, auffallend ist jedoch, dass in silico zahlreiche Fragmente bis 50 bp vorhanden sind, in der inkubierten Probe ist die Anzahl der Peaks unter 50 bp gering. Diese kurzen Fragmente könnten zum Teil während des Entsalzen der Fragmente verloren gegangen sein, da die Porengröße der Filter mit $0,025 \text{ }\mu\text{m}$ ein diffundieren von Sequenzen bis zu einer Größe von knapp 70 bp ermöglicht (Lodish *et al.* 2001). Die große Dichte der Fragmente mit einer Länge von 50 bis 200 bp und zwischen 400 – 500 bp entspricht der in silico vorhergesagten Diversität. Legt man die jeweils ersten Peaks der T-RFLPs übereinander um sie zu alignen stimmen die Längen der Fragmente der beiden T-RFLPs besser überein. Dennoch ist es sehr schwierig die korrespondierende Sequenz eines Peaks ausfindig zu machen

4. Diskussion

Ziel dieser Arbeit war es unbekannte sulfatreduzierende Organismen in arktischen, marinen Sedimenten aus Svalbard zu identifizieren. Entsprechende Sedimente oder einzelne, daraus isolierte Organismen wurden bereits in anderen Studien inkubiert und Wachstums-, Sulfatreduktions- und Umsatzraten diverser Substrate erforscht (Knoblauch & Jørgensens 1999; Knoblauch *et al.* 1999; Ravenschlag *et al.* 2000; Sagemann *et al.* 1998; Finke *et al.* 2007). In der vorliegenden Diplomarbeit wurde versucht aus der breiten Masse nachgewiesener SRM (Ravenschlag *et al.* 1999; Teske *et al.* 2011) jene Organismen welche aktiv Azetat verwerten zu identifizieren. Dies geschah durch eine Inkubation bei Bedingungen wie sie an den natürlichen Standorten herrschen. Daher wurde eine Inkubationstemperatur von 0°C, Dunkelheit und eine Azetatkonzentration von 50 µM gewählt. In der mikrobiellen Ökologie ist es von großer Bedeutung eine Verbindung zwischen der Identität unkultivierter Mikroorganismen zu deren metabolischem Potential herzustellen herzustellen (Neufeld *et al.* 2007). Um diesem Ziel näher zu kommen, wurde ‚Stable Isotope Probing‘ (SIP) durch Inkubation von Sedimentproben mit ¹³C markiertem Azetat durchgeführt. SIP ist eine effiziente Methode, um phylogenetische Information über metabolisch interessante Organismen zu gewinnen. So konnten Boschker *et al.* (1998) durch Inkubation mit ¹³C Azetat, Phospholipid-Fettsäuren markieren und daraus phylogenetische Information erhalten. Ein nächster Schritt war die Verwendung von DNA welche einen weitaus besseren phylogenetischen Marker darstellt als Phospholipide (Radajewski *et al.* 2000). Als ein weiterer bedeutender Schritt der Entwicklung der Technik galt die Verwendung von RNA anstatt DNA. Somit konnte in einer mikrobiellen Gemeinschaft nachgewiesen werden, dass Phenol degradierende Bakterien der Gattung *Thauera* angehören (Manefield *et al.* 2002). Organismen replizieren DNA bei Zellteilungen. Daher ist der Einbau von ¹³C-Kohlenstoff an Wachstum der Bakterien gebunden. In RNA wird Kohlenstoff bei Stoffwechselvorgängen eingebaut, wodurch Aktivität der Organismen in RNA schneller nachzuweisen ist als in DNA. Auch die Inkorporationsrate von ¹³C für RNA ist höher als die DNA Inkorporationsrate, im Beispiel Phenol degradierender Bakterien um das 6,5 fache (Manefield *et al.* 2007). Daher sind kürzere Inkubationszeiten erforderlich, wodurch das so genannte ‚Cross-feeding‘ also die Weitergabe isotopisch markierter Substrate in der mikrobiellen ‚Nahrungskette‘ eingeschränkt wird. Ein weiterer Vorteil der Isolation von RNA ist, dass es in der Zelle wichtige Aufgaben erfüllt und kein Organismus ohne RNA existiert. Zudem ist RNA eines der ältesten Moleküle der Evolution, die 16S rRNA beinhaltet viel Information über die Abstammung eines Organismus und gilt als genetisches Markermolekül. Daher gibt es große Datenbanken der 16S rRNA Sequenzen um zwischen verschiedenen Entwicklungslinien zu unterscheiden (Whiteley *et al.* 2007).

Um den in situ Bedingungen möglichst ähnliche Verhältnisse zu gewährleisten, wurde Azetat in einer Konzentration von 50 μM zugegeben, was in etwa jenen, von Finke *et al.* (2007) gemessenen in situ Konzentrationen von 45 μM entspricht. Durch tägliche neue Beimengung entsprechender Azetatsmengen wurde der von Finke *et al.* (2007) berechnete Verbrauch von rund 15 nmol ml^{-1} kompensiert. In traditionellen SIP Studien wird nach einer Vorinkubation das Substrat einmalig in einer sehr hohen Konzentration zugegeben (Puls-Labeling). Dadurch wird zwar eine höhere Labeling-Effizienz erzielt, allerdings erhöht sich die Wahrscheinlichkeit die mikrobielle Gemeinschaft zu beeinflussen und somit einer Verfälschung der Ergebnisse. Neben der Inkubation mit ^{13}C -Azetat wurde eine Inkubation mit ^{12}C -Azetat durchgeführt um durch Gegenüberstellen der ^{12}C und ^{13}C RNA nachzuweisen, dass RNA in schweren Fraktionen durch Veränderung der isotopischen Zusammensetzung erfolgte. Eine Probe ohne Azetatbeimengung wurde inkubiert um eventuell auftretende Effekte der Inkubation verfolgen zu können. Ein weiteres Replikat der Inkubationen welche durch Molybdat inhibiert wurden, stoppten die Sulfatreduktion in den Proben nachweislich (siehe Abschnitt 3.1). Durch diese Inkubation konnte man kontrollieren, dass in ^{13}C -Azetat nachgewiesene Peaks, aufgrund der Sulfatreduktion zustande kamen.

Durch kurze Inkubationszeit sollte die Weitergabe der ^{13}C Isotope innerhalb der mikrobiellen Nahrungskette verhindert werden, sodass nur Primärkonsumenten des Substrats identifiziert werden. Bisher bekannte untersuchte Stämme von Bakterien wiesen bei einer Inkubation bei $-1,8^\circ\text{C}$ (dem Gefrierpunkt des Meerwassers), eine Verdoppelungszeit von vier Tagen bis über fünf Wochen auf (Knoblauch *et al.* 1999a). Da für RNA-SIP keine Verdoppelung der Zellen Bedingung ist, schien die Zeit der Inkubation von Station J von drei Wochen ausreichend. Die Überprüfung der Aktivität der SRM wurde durch Messung der Sulfatreduktionsrate durchgeführt.

4.1. Sulfatreduktionsraten

Wird den Proben ^{12}C oder ^{13}C -Azetat hinzugefügt, ist die SRR, im Gegensatz zur inhibierten Probe konstant auf einem höheren Niveau. Daraus lässt sich schließen, dass Azetat von SRM verwendet wird um Sulfat zu reduzieren. Die Sulfatreduktionsrate der ^{12}C und ^{13}C -Azetat Proben unterscheiden sich in der Aktivität der Mikroorganismen nur geringfügig, weshalb sich die Probe mit ^{12}C -Azetat sehr gut als Kontrollprobe. Auch die inhibierte Probe ist durch ihre verschwindend geringe Sulfatreduktion eine ausgezeichnete Negativkontrolle. Der Probenansatz um ‚bottle effects‘ zu überprüfen, weist eine Sulfatreduktionsrate von ca. 60% der ^{12}C und ^{13}C Proben auf. Dies verdeutlicht, dass auch ohne Azetataddition ausreichend Substrate in den Sedimentproben vorhanden sind. Dieser Umstand trägt natürlich zur Verdünnung der isotopischen Markierung bei da die natürlich vorkommenden Substrate auch in den Azetatinkubationen verwendet werden.

4.2. SIP

Die Ergebnisse der T-RFLP Analyse zeigen eine phylogenetische Diversität der bakteriellen Gemeinschaft des Sediments auf. Zu ergründen welche Organismen in Sedimenten von Station J auf Svalbard aktiv Sulfat reduzieren, ist auch in dieser Studie nicht gelungen.

Nach einer Studie von Ravenschlag *et al.* (2000) handelt es sich bei Sedimentproben entsprechender Tiefe aus Station J um 21,3% aller DAPI gefärbten Zellen um SRM. Betrachtet man SRM aus Station J genauer, wurde durch Kultivierung gezeigt, dass vollständige Oxidierer um das 10 bis 100fache geringere Abundanz aufweisen als unvollständige Oxidierer (Knoblauch *et al.* 1999). Die Zielgruppe der SRM welche Azetat in den Inkubationsproben verwerten ist also relativ rar vorhanden. Die Bestimmung des ^{13}C -Kohlenstoffgehalts der RNA aus Inkubation der Station J und des *E. coli* Stammes mittels IRMS zeigte eine schwache Anreicherung an schweren Isotopen. Der Unterschied zwischen ^{12}C und ^{13}C Proben ist mit rund 0.02 % bei untersuchter RNA vom 18. Tag der Inkubation sehr gering. Da man aber aufgrund der vorhandenen Daten davon ausgehen muss, dass nur eine sehr geringe Anzahl, das Substrat verwerteten, könnten diese wenigen Bakterien sehr stark markiert sein. Zudem macht RNA in einer exponentiell wachsenden *E.coli* Zelle rund 20% des Trockengewichtes aus (Neidhart & Umbarger, 1996).

Obwohl Isotopen-Massenspektrometrie sehr sensibel ist, kann eine Anreicherung an ^{13}C Isotopen nach nur einer Messung nicht mit Sicherheit festgestellt werden. Auch in einer Studie über Phenol degradierende Bakterien wurde festgestellt, dass nur ein Prozent des zugegebenen Kohlenstoffes in Nukleotide eingebaut wurde (Manefield *et al.* 2007). Dennoch wurde über IRMS Messung eine überraschend geringe Markierung der RNA von unter 0.1% des Kohlenstoffes gemessen. Ein Höchstwert von 1,1 Atomprozent ^{13}C in der Inkubationsprobe von Tag 21 ist im Vergleich zu über 43% der *E.coli* RNA verschwindend klein. Eine eher schwache Markierung ist nicht überraschend, bedenkt man die relativ geringen Azetatkonzentrationen der Inkubation und die generell lange Wachstumsdauer aufgrund der niedrigen Energieeffizienz der dissimilatorischen Sulfatreduktion (Thauer *et al.* 1977). Zusätzlich ist aufgrund der hohen Sulfatreduktionraten in den inkubierten Proben ohne Azetatzugabe eine große Menge an unmarkiertem Substrat im Sediment vorhanden. In den Umweltproben ist daher auf sehr geringe Markierung der gesamten Probe, beziehungsweise auf spezifische Markierung zu schließen.

Da bei Zentrifugationstests mit *E.coli* keine Probleme auftraten und mittels des RNA Fluoreszenzfarbstoffes RiboGreen® schwere RNA nachgewiesen werden konnte, wurden Gradienten mit RNA Proben aus Tag 11, 18 und 21 der Inkubation aus Station J untersucht. Während der Peak der RNA vom Tag 11 bei einer Dichte von 1,75 zu finden ist, ist die meiste RNA des Tages 18 bei einer

Dichte von 1,78 und darüber. Dies ist ein Hinweis, dass sich die Zusammensetzung der RNA auf Kohlenstoffbasis über den Zeitraum einer Woche verändert hatte. Die Konzentrationen der RNA vom 21. Tag der Inkubation über den Dichtegradienten waren durchwegs sehr gering. Die Verteilung der RNA entspricht relativ der des Gradienten mit RNA aus Tag 18. Nach nur drei Tagen längerer Inkubation ist auch keine große Verlagerung der RNA in Fraktionen höherer Dichte zu erwarten. Darin liegt auch eine Erklärung für die geringen Unterschiede der IRMS Kohlenstoffanalyse der RNA Proben von Tag 18 und 21 der Inkubation. Von großer Relevanz wäre ein Unterschied der Daten von Tag 0 und einem erheblich späteren Zeitpunkt der ^{13}C -Azetat Inkubation.

Ein Grund für die schwache Markierung der RNA liegt zum Teil daran, dass noch viel natürlich vorkommende Substrate in den Sedimentproben zur Verfügung standen. Neben Azetat sind weitere Elektronendonatoren zahlreich im Sediment vorhanden, welche aktiv von SRM umgesetzt und als Kohlenstoffquelle verwendet werden. In Sedimentschichten von 5-9 cm aus Smeerenburgfjorden ist Azetat, nach Datenerhebung mit bis zu 50% das wichtigste Substrat, gefolgt von Propionat (7,9%), Lactat (2,9%) und Isobutyrat (1,3%) (Finke *et al.* 2007). Diese Substrate sind in der Inkubation aber nicht mit ^{13}C -Kohlenstoff markiert und haben so keinen positiven Einfluss auf die Akkumulation von ^{13}C Isotopen in RNA. Zudem wies Sahm *et al.* (1999) über rRNA Hybridisierung in Sedimenten Svalbards eine höhere Abundanz der unvollständig oxidierenden SRM nach als vollständiger Oxidierer. Diese Gruppe der SRM oxidiert organische Verbindungen wie Aminosäuren, Zuckern und Fettsäuren, welche als Kohlenstoffquelle dienen, zu Azetat. Dazu gehören die Familien der *Desulfovibrionaceae*, *Desulfolobaceae* und *Desulfobulbaceae*. Durch die Aktivität dieser Bakterien wird zugegebenes markiertes Azetat wiederum mit unmarkiertem Azetat „verdünnt“.

Obwohl mittels RiboGreen® nur wenig schwere RNA nachgewiesen wurde, konnte nach sofortiger Transkription der RNA in DNA auch in Fraktionen hoher Dichte genügend PCR Produkt generiert werden. Nach langer Lagerung der fraktionierten RNA bei -80°C ist eine erfolgreiche Transkription und Amplifizierung der cDNA nicht möglich.

RNA wird über den Dichtegradienten üblicherweise normal verteilt (Whiteley 2007). So könnte unmarkierte RNA von sehr abundanten Organismen auch in Fraktionen hoher Dichte vorhanden sein. Vor allem bei schwacher Markierung ist Vorsicht geboten, ob es sich tatsächlich um markierte, oder nur GC-reiche RNA handelt (Dumont & Murrell, 2005).

Eine Analyse der Diversität der RNA in den unterschiedlichen Dichtefractionen erfolgte über zeitgleich durchgeführte T-RFLP. Die Technik des T-RFLP ist eine erprobte und reproduzierbare Technik für „community fingerprinting“. Erstmals wurde eine T-RFLP Studie bakterieller Gemeinschaften in natürlichen Habitaten von Liu *et al.* (1998) an Belebtschlamm durchgeführt. T-RFLP ermöglicht die Diversität eines bestimmten Habitats zu bestimmen, dominante Mitglieder

einer mikrobiellen Gemeinschaft zu identifizieren oder Populationsdynamik zu beobachten. Damit eine qualitative und quantitative Analyse der Organismen möglich ist, müssen Ergebnisse reproduzierbar sein (Osborn *et al.* 2000). Bei den durchgeführten T-RFLP konnten zwischen den leichten Fraktionen hohe Reproduzierbarkeit erreicht werden (siehe Abb.13). Dennoch ist eine T-RFLP Analyse nicht ausreichend um die genaue Länge eines Fragments und so die Identität des Organismus zu bestimmen (Andeer *et al.* 2011). In Versuchen mit Plasmiden, welche bekannte Sequenzen enthielten, wurden zwischen der berechneten Länge eines Fragments und dem Peak des T-RFLPs Unterschiede von 10-20 bp festgestellt. Dieser Fehler trat stets in anderem Ausmaß auf. Somit gab es keine Möglichkeit vom T-RFLP Profil auf die tatsächliche Länge des Fragments zurück zu rechnen. Eine weitere Fehlerquelle liegt in der Präferenz von Primern an bestimmte Sequenzen. So konnte selbst in einfachen künstlichen mikrobiellen Gemeinschaften eine Neigung zu bestimmten Amplifikaten festgestellt werden (Suzuki & Giovannoni, 1996).

Bei den Inkubationsproben ist anzunehmen, dass unterschiedliche Sequenzen für einen Peak verantwortlich sind, wenn die Länge des Restriktionsfragments zufällig gleich ist. Es kann außerdem angenommen werden dass, wenige, den Bedingungen angepasste Organismen sehr häufig vorkommen und deren Restriktionsfragmente einen hohen und breiten Peak wiedergeben. Sind die Größenunterschiede zu anderen Fragmente nur minimal, folgt eine Überlagerung der Peaks wodurch keine Unterscheidung der Peaks möglich ist.

Unvollständig verdaute PCR Produkte der mikrobiellen Gemeinschaft scheinen als zusätzliche Peaks im T-RFLP Profil auf und führen zu einer Überschätzung der Diversität (Osborn *et al.* 2000). Das Auftreten oder die Intensität der ‚Pseudo-TRFs‘ kann nicht durch Verwendung hoher Konzentrationen des Restriktionsenzym oder eine übermäßig lange Restriktionsdauer verändert werden (Egert & Friedrich, 2003).

Sequenzen der Sedimentproben aus Station J (Hubert *et al.* 2010) welche nach einem in silico Verdaue durch MSP I der Fragmentlänge von 45, 62, 64 und 486 bp entsprachen wurden mittels BLAST auf ihre nächsten Verwandten untersucht. Die höchste Ähnlichkeit waren ausnahmslos unkultivierte marine Bakterien. Die den Sequenzen am nächsten verwandten, bekannten Organismen waren jeweils unkultivierte Deltaproteobakterien. Aus der bis dato vorhandenen Datenmenge des Habitats, konnte nicht zwischen aktiven und inaktiven Bakterien unterschieden werden.

Um aus der RNA-SIP Studie Erkenntnis über die aktiven Zellen zu gewinnen, müssten zum Vergleich T-RFLP der RNA Proben aus Inkubationen mit ¹²C-Azetat durchgeführt werden. Wenn auch hier selbe Peaks im T-RFLP Profil nachgewiesen werden können, allerdings in Fraktionen geringerer Dichte, handelt es sich um die gesuchten Sulfatreduzierer welche das hinzugefügte Azetat verwerteten. Eine Analyse von RNA Proben zu Beginn der Inkubationen zeigt zum Vergleich die Diversität der

natürlichen mikrobiellen Gemeinschaft. Organismen welche nach drei Wochen Inkubationszeit in schweren Fraktionen nachweisbar sind, sollten in Proben vom ersten Tag der Inkubation in leichten Fraktionen vorhanden sein. Da T-RFLP auch quantitative Eigenschaften hat, könnte überprüft werden, ob sich die Intensität bestimmter Peaks über einen Zeitraum verändert. Abgesehen von Intensitätsunterschieden zwischen den unterschiedlichen T-RFLP Messungen, kann die relative Intensität der Peaks zueinander verglichen werden. Bleibt diese konstant, wurden die Bedingungen der Inkubation sehr gut an die in situ Gegebenheiten angepasst und eine Veränderung der mikrobiellen Gemeinschaft verhindert. Diese Ergebnisse können mit Vorbehalten interpretiert werden, da durch Regulierung der Transkription und resultierende unterschiedliche Anzahlen an Kopien der rRNA und in unterschiedlichen Bakterien die gemessene Abundanz nicht der tatsächlich vorherrschenden Situation entsprechen muss (von Wintzgerode *et al.* 1997). In Proben mit Molybdat als Inhibitor der Sulfatreduktion sollte sich die mikrobielle Gemeinschaft zu Gunsten von Bakterien geändert haben, welche nicht zu den SRM zählen. Durch das Molybdat wird die Aktivität der sulfatreduzierenden Organismen des Sediments verhindert. Auch diese Veränderung der mikrobiellen Gemeinschaft müsste über den Zeitraum der Inkubation über T-RFLP Profile verfolgt werden können. T-RFLP Peaks aktiver SRM welche mit ^{13}C Azetat in Fraktionen hoher Dichte auftreten, würden in diesen Proben keinen, oder nur einen leichten Peak in einer leichten Fraktion wiedergeben. Von Sedimentproben denen kein Substrat zugegeben wurde, sollte die mikrobielle Zusammensetzung ähnlich der Proben mit Azetatbeigabe sein. Durch die ebenfalls hohe Sulfatreduktionsrate dieser Inkubationen wird nicht von einem Mangel an Substraten ausgegangen.

5. Zusammenfassung

Zwischen 32 und 46% der Primärproduktion der Ozeane weltweit sinkt auf den Meeresgrund. Die produzierten organischen Verbindungen werden reoxidiert und in anoxischen Bereichen des Meeresbodens nützen Mikroorganismen unter anderem Nitrat, Eisen, Mangan oder Sulfat als Elektronenakzeptor. Vor allem in Küstengebieten spielen sulfatreduzierende Mikroorganismen eine wichtige Rolle in der Remineralisation von Biomasse.

Da rund 90% der Meeressedimente eine Temperatur von 4°C und darunter aufweisen haben psychrophile Bakterien eine enorme Bedeutung. Aufgrund der hohen Sulfatkonzentration von rund 28 mM und den anoxischen Bedingungen sind marine Sedimente eines der wichtigsten Habitate von SRM. Es wurden bereits mehrere Studien über die mikrobielle Gemeinschaft und deren physiologische Eigenschaften der Sedimente durchgeführt und in der häufig beprobten Station J deutliche Unterschiede zwischen den obersten Schichten bis 2 cm und der folgenden Schicht von rund 5 cm festgestellt. In einer Tiefe von 5-9 cm sind sulfatreduzierende Organismen für die Produktion von 96% des gelösten, anorganischen Kohlenstoffs verantwortlich.

Es wurden bereits zahlreiche Studien zur Diversität der mikrobiellen Gemeinschaft dieses Lebensraumes durchgeführt, aber die Identität aller SRM konnte bislang nicht eruiert werden. So war es Ziel dieser Studie durch RNA ‚stable isotope probing‘ aktive SRM der Sedimente nachzuweisen und zu beschreiben. Nach Inkubation der arktischen, marinen Sedimentproben mit ^{13}C Kohlenstoff markiertem Azetat wurde RNA isoliert und schwere von leichter RNA über Zentrifugation eines Dichtegradienten getrennt. In den einzelnen Fraktionen des Gradienten wurde RNA quantifiziert und mit Hilfe von bakteriellen T-RFLP Analysen der 16S rRNA Gene untersucht. Während der Inkubation der Sedimente wurde die Sulfatreduktionsrate ermittelt und ein positiver Effekt der Azetatzugabe auf die Sulfatreduktion nachgewiesen. Die Aktivität von SRM wurde so nachgewiesen und durch Isotopen Massenspektrometrie und RiboGreen® Analysen der Gradienten konnte eine geringe Anreicherung von ^{13}C -Kohlenstoff in isolierter RNA festgestellt werden. Leichte Fraktionen waren durch eine große Anzahl an unterschiedlich langen Restriktionsfragmenten gekennzeichnet. In schweren Fraktionen konnten einzelne replizierbare Peaks nachgewiesen werden, welche in keiner der leichten Fraktionen detektierbar waren. Um durch den Vergleich mit den bekannten Sequenzen zu ergründen um welche Organismen es sich dabei handelt ist die T-RFLP Analyse zu ungenau und Klonieren und Sequenzieren der Nukleotide aus schweren Fraktionen unumgänglich. Weitere Untersuchungen von Replikaten der Inkubation, sowie früherer Zeitpunkte und Kontrollen sind notwendig, um auszuschließen, dass es sich nicht um Kontaminationen der Fraktionen handelt. In durchgeführten Experimenten konnte zwar nachgewiesen werden, dass in den Inkubationsproben an die Azetatzugabe gekoppelt Sulfat reduziert wurde, die Identität jener Mikroorganismen bleibt aber nach wie vor im Dunkeln.

6. Literatur

- Andeer, P., Strand S. E., Stahl D. A. (2011) High Sensitivity Stable Isotope Probing by Quantitative TRFLP. *Appl Environ Microbiol*, online published
- Alewel, C. and A. Giesemann (1996) Sulfate reduction in a forested catchment as indicated by $\delta^{34}\text{S}$ values of sulfate in soil solutions and runoff. *Isotopes Environm. Health Studies* **32**: 203-210.
- Alewel, C. & M. Novak (2001). Spotting zones of dissimilatory sulfate reduction in a forested catchment: the ^{34}S - ^{35}S approach. *Environ Pollut* **112**(3): 369-377.
- Altschul, S.F., Gish W., Miller W., Myers E.W., Lipman D. J. (1990) Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* **215**: 403-410.
- Arnosti, C., Sageman J., Jørgensen B.B., Thamdrup, B. (1998) Temperature dependence of microbial degradation of organic matter in marine sediments: polysaccharide hydrolysis, oxygen consumption, and sulfate reduction. *Mar Ecol Prog Ser* **165**: 59-70.
- Badziong, W. & Thauer, R. K. (1978) Growth yields and growth rates of *Desulfovibrio vulgaris* (Marburg) growing on hydrogen plus sulphate and hydrogen plus thiosulphate as sole energy sources. *Arch Microbiol* **117**: 209-214.
- Baena, S., Fardeau M.-L., Labat M., Ollivier B., Garcia J.-L., Patel B. K. C. (1998) *Desulfovibrio aminophilus* sp. nov., a novel amino acid degrading and sulphate reducing bacterium from an anaerobic dairy wastewater lagoon. *J Syst Appl Microbiol* **21**: 498-504.
- Bagwell, C. E., Liu X., Wu L., Zhou J. (2006) Effects of legacy nuclear waste on the compositional diversity and distributions of sulphate-reducing bacteria in a terrestrial subsurface aquifer. *FEMS Microbiol Ecol* **55**(3): 424-431.
- Barisic, I. (2008) Diversität und Verteilung von sulfatreduzierenden Prokaryoten in marinen Sedimenten. *Department für Mikrobielle Ökologie, Universität Wien. Mag. rer. nat.*:115.
- Ben-Dov, E., Brenner, A. and Kushmaro, A. (2007) Quantification of sulfate-reducing bacteria in industrial wastewater, by real-time polymerase chain reaction (PCR) using *dsrA* and *apsA* genes. *Microb Ecol* **54**: 439-451.
- Berry, D., Mahfoudh K. B., Wagner M., Loy A. (2011) Barcoded Primers Used in Multiplex Amplicon Pyrosequencing Bias Amplification. *Appl Environ Microbiol* **77**:7846-7849
- Blackburn, T.H. (1987) Microbial food webs in sediments. *Microbes in the Sea* (Sleigh MA, ed) pp. 39-58. Ellis Horwood, Chichester.
- Bodrossy L., Stralis-Pavese N., Konrad-Koszler M., Weilharter A., Reichenauer T.G., Schofer D. et al. (2006) mRNA-based parallel detection of active methanotroph populations by use of a diagnostic microarray. *Appl Environ Microbiol* **72**: 1672-1676.
- Boschker, H. T. S., Nold, S. C. Wellsbury, P., Bos. D., de Graaf, W., Pel, R., Parkes, R. J. (1998) Direct linking of microbial populations to specific biogeochemical processes by ^{13}C -labelling of biomarkers. *Nature* **392**: 801-805.

- Brandisheep, A. Gebhardt N. A., Thauer R.K., Widdel F., Pfennig N. (1983) ANAEROBIC AZETATE OXIDATION TO CO² BY DESULFOBACTER-POSTGATEI. 1. DEMONSTRATION OF ALL ENZYMES REQUIRED FOR THE OPERATION OF THE CITRIC-ACID CYCLE. *Archives of Microbiology* **136**: 222-229.
- Canfield, D.E., Jørgensen, B.B., Fossing, H. et. al. (1993) Pathways of organic carbon oxidation in three continental margin sediments. *Mar Geol* **113**: 27-40.
- Capone, D. G. und Keine, R. S. (1988) Comparison of microbial dynamics in marine and freshwater sediments: contrasts in anaerobic carbon catabolism. *Limnol Oceanogr* **29**: 189-192.
- Castro, H.F., Williams, N.H. and Ogram, A. (2000) Phylogeny of sulfate-reducing bacteria(1). *FEMS Microbiol Ecol* **31**: 1-9.
- Cho, J.C., Vergin K. L., Morris R. M., Giovannoni S. J. (2004) *Lentisphaera araneosa* gen. nov., sp. nov, a transparent exopolymer producing marine bacterium, and the description of a novel bacterial phylum, Lentisphaerae. *Environ. Microbiol.* **6**:611- 621.
- Christensen, D (1984) Determination of substrates oxidized by sulphate reduction in intact cores of marine sediments. *Limnol Oceanogr* **29**: 189-192
- Devereux, R., and G. W. Mundfrom. (1994) A phylogenetic tree of 16S rRNA sequences from sulfate-reducing bacteria in a sandy marine sediment. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**:3437–3439
- Dhillon, A., A. Teske, J. Dillon, D. A. Stahl, and M. L. Sogin. (2003) Molecular characterization of sulfate-reducing bacteria in the Guaymas Basin. *Appl Environ Microbiol* **69**:2765–2772.
- Dojka, M.A., Hugenholtz P., Haack S. K., Pace N. R. (1998) Microbial diversity in a hydrocarbon- and chlorinated-solvent contaminated aquifer undergoing intrinsic bioremediation. *Appl Environ Microbiol* **64**: 3869-3877.
- Dumont, M. G. & Murrell J. C. (2005) Stable isotope probing – linking microbial identity to function. *Nat Rev Microbiol* **3**: 499-504.
- Durbin, A. (2009) Microbial diversity of oligotrophic marine sediments. Diplomarbeit, University of North Carolina, Chapel Hill.
- Egert, M., Friedrich M. W. (2003) Formation of Pseudo-Terminal Restriction Fragments, a PCR-Related Bias Affecting Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis of Microbial Community Structure. *Appl Environ Microbiol* **69**:2555-2562.
- Elshahed, M.S., Youssef N. H., Luo Q., Najjar F. Z., Roe B.A., Siski T. M., Bühring S. I., Hinrichs K.-U., Krumholz L. R. (2007) Phylogenetic and metabolic diversity of Planctomycetes from anaerobic, sulfide- and sulfur-rich Zedler Spring, Oklahoma. *Appl Environ Microbiol* **73**:4707-4716.
- Finke, N., Vandieken V., Jørgensen B. B. (2007) Azetate, lactate, propionate, and isobutyrate as electron donors for iron and sulfate reduction in Arctic marine sediments, Svalbard. *FEMS Microbiol Ecol* **59**:10-22.
- Frederiksen, T. M. and K. Finster (2004) The transformation of inorganic sulfur compounds and the assimilation of organic and inorganic carbon by the sulfur disproportionating bacterium *Desulfocapsa sulfoexigens*. *Antonie Van Leeuwenhoek* **85**(2): 141-9.

- Fuseler, K. and H. Cypionka (1995) Elemental sulfur as an intermediate of sulfide oxidation with oxygen by *Desulfobulbus propionicus*. *Archives of Microbiology* **164**(2): 104-109.
- Glud, R. N., Holby, O., Hoffman, F., Canfield, D. E. (1998) Benthic mineralization and exchange in Arctic marine sediments (Svalbard, Norway). *Mar Ecol Prog Ser.* **173**:237-251.
- Hansen, T. A. (1994). "Metabolism of sulfate-reducing prokaryotes." *Antonie van Leeuwenhoek* **66**: 165- 185.
- Hattori, S., Kamagata, Y., Hanada, S. and Shoun, H. (2000) *Thermacetogenium phaeum* gen. nov., sp. nov., a strictly anaerobic, thermophilic, syntrophic acetate-oxidizing bacterium. *Int J Syst Evol Microbiol* **50 Pt 4**, 1601-1609.
- Hubert C., Arnosti C., Brücert V., Loy A., Vandleken V., Jørgensen B.B. (2010) Thermophilic in Arctic marine sediments induced to mineralize complex organic matter at high temperature. *Environ Microbiol* **10**: 1462-2920.
- Inagaki, F., Nunoura T., Nakagawa S., Teske A., Lever M. A., Lauer A., Suzuki M., Takai K., Delwiche M., Colwell F.S., Nealson K.H., Horikoshi K., D'Hondt S. L., Jørgensen B. B. (2006) Biogeographical distribution and diversity of microbes in methane hydrate-bearing deep marine sediments on the Pacific Ocean Margin. *Proc Natl Acad Sci USA* **103**:2815-2820.
- Ingvorsen, K., Zeikus, J.G. and Brock, T.D. (1981) Dynamics of Bacterial Sulfate Reduction in a Eutrophic Lake. *Appl Environ Microbiol* **42**: 1029-1036.
- Jeanthon, C., L'Haridon, S., Cuffe, V., Banta, A., Reysenbach, A.L. and Prieur, D. (2002) *Thermodesulfobacterium hydrogenophilum* sp. nov., a thermophilic, chemolithoautotrophic, sulfate-reducing bacterium isolated from a deep-sea hydrothermal vent at Guaymas Basin, and emendation of the genus *Thermodesulfobacterium*. *Int J Syst Evol Microbiol* **52**:765-772.
- Jenkins, O., Byrom D., Jones D. (1987) *Methylophilus*: a new genus of methanol utilizing bacteria. *Int J Syst Bacteriol* **37**: 446-448.
- Jensen M.A. & Straus N. (1993) Effect of PCR conditions on the formation of heteroduplex and single-stranded-DNA products in the amplification of bacterial ribosomal DNA spacer regions. *PCR Meth Appl* **3**: 186-194.
- Jørgensen, B.B. (1982) Mineralization of organic matter in the sea bed – the role of sulphate reduction. *Nature* **296**: 643-645.
- Kallmeyer, J., Ferdelman T.G., Weber A., Fossing H., Jørgensen B.B. (2004) A cold chromium distillation procedure for radiolabeled sulfide applied to sulphate reduction measurements. *Limnol Oceanogr Methods* **2**: 171–180.
- Kjeldsen, K. U., Tang L., Jørgensen M. G., Ingvorsen K. (2009) Enumeration and identification of dominant types of sulfate-reducing bacteria in pulp from a paper-recycling plant: a multiphasic approach. *FEMS Microbiol. Ecol.* **69**:481–494.
- Kniemeyer, O., T. Fischer, et al. (2003). Anaerobic degradation of ethylbenzene by a new type of marine sulfate-reducing bacterium. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**(2): 760-768.

- Knoblauch, C. & Jørgensen B. B. (1999a) Effect of temperature on sulphate reduction, growth rate and growth yield in five psychrophilic sulfate-reducing bacteria from Arctic sediments. *Environ Microbiol.* **1**:457-467.
- Knoblauch, C., Sahm K., Jørgensen B. B. (1999b) Psychrophilic sulfate-reducing bacteria isolated from permanently cold Arctic marine sediments: description of *Desulfofrigus oceanense* gen. nov., sp. nov., *Desulfofrigus fragile* sp. nov., *Desulfobaba gelida* gen. nov., sp. nov., *Desulfotalea psychrophila* gen. nov., sp. nov. and *Desulfotalea arctica* sp. nov. *Int J Syst Bacteriol* **49**:1631-1643.
- Krumholz, L. R., S. H. Harris, et al. (1999). Characterization of two subsurface H₂-utilizing bacteria, *Desulfomicrobium hypogeium* sp. nov. and *Acetobacterium psammolithicum* sp. nov., and their ecological roles. *Appl Environ Microbiol* **65**(6): 2300-2306.
- Langendijk, P. S., J. T. J. Hanssen, and J. S. van der Hoeven (2000) Sulfatereducing bacteria in association with human periodontitis. *J Clin Periodontol* **27**:943–950.
- Langendijk, P.S., Kulik E.M. et al. (2001) Isolation of *Desulfomicrobium orale* sp. nov. and *Desulfovibrio* strain NY682, oral sulfate-reducing bacteria involved in human periodontal disease. *Int J Syst Evol Microbiol* **51**(3): 1035-1044.
- Lebherz-Eichinger, D. (2009) Diversität von psychrophilen sulfatreduzierenden und thermophilen sporenbildenden Mikroorganismen im arktischen Meeressediment vor Spitzbergen. *Department für Mikrobielle Ökologie, Universität Wien. Mag. rer. nat.*: 119
- Lehman, R. M., F. F. Roberto, et al. (2001) Attached and unattached bacterial communities in a 120 meter corehole in an acidic, crystalline rock aquifer. *Appl Environ Microbiol* **67**(5): 2095-2106.
- Levitus, S., Boyer, T. (1994) World ocean atlas. Vol. 4. Temperature U.S. Department of Commerce, Washington, D.C.
- Liu, W. T., Marsh T. L., Cheng, and Forney L. J. (1997) Characterization of microbial diversity by determining terminal H. restriction fragment length polymorphisms of genes encoding 16S rRNA. *Appl Environ Microbiol* **63**:4516–4522.
- Liu, W. T., Marsh T. L., Forney L. J. (1998) Determination of the microbial diversity of anaerobic-aerobic activated sludge by a novel molecular biological technique. *Water Sci Technol* **37**: 417-422
- Lodish, H., Berk A., Ziprsky S. C., Matsudaria P., Baltimore D., Darnell J.E.. (2001) Molekulare Zellbiologie. 4. Auflage. Spektrum Verlag, Heidelberg
- Loubinoux, J., F. Mory, I. A. Pereira, and A. E. Le Faou (2000) Bacteremia caused by a strain of *Desulfovibrio* related to the provisionally named *Desulfovibrio fairfieldensis*. *J Clin Microbiol* **38**:931–934.
- Loubinoux, J., Bisson-Boutelliez, C. et al. (2002a) Isolation of the provisionally named *Desulfovibrio fairfieldensis* from human periodontal pockets. *Oral Microbiol Immunol* **17**(5): 321-323.
- Loubinoux, J., Bronowicki, J.P. et al. (2002b) Sulfate-reducing bacteria in human feces and their association with inflammatory bowel diseases. *FEMS Microbiol Ecol* **1341**: 1-6.

- Lüders T., Manefield M., Friedrich M.W. (2004) Enhanced sensitivity of DNA and rRNA-based stable isotope probing by fractionation and quantitative analysis of isopycnic centrifugation gradients. *Environ Microbiol* **6**: 73-78.
- Lovley, D. R., Phillips E. J. P. (1989) Requirement for a microbial consortium to completely oxidize glucose in Fe(III)-reducing sediments. *Appl Environ Microbiol* **55**:3234-3236.
- Loy, A., Küsel K., Lehner A., Drake H.L. and Wagner, M. (2004) Microarray and functional gene analyses of sulfate-reducing prokaryotes in low-sulfate, acidic fens reveal cooccurrence of recognized genera and novel lineages. *Applied And Environmental Microbiology* **70**, 6998-7009.
- Loy A., Lehner A., Lee N., Adamczyk J., Meier H., Ernst J. et al. (2002) Oligonucleotide microarray for 16S rRNA gene-based detection of all recognized lineages of sulfate-reducing prokaryotes in the environment. *Appl Environm Microbiol* **68**: 5064-5081.
- Madigan, M. T., J. M. Martinko, et al. (2003) Brock. Biology of Microorganisms. Upper Saddle River, New Jersey, Prentice-Hall
- Magot, M., Ravot, G. et al. (1997) *Dethiosulfovibrio peptidovorans* gen. nov., sp. nov., a new anaerobic, slightly halophilic, thiosulfate-reducing bacterium from corroding offshore oil wells. *Int J Syst Bacteriol* **47**(3): 818-24.
- Manefield, M., Whiteley A. S., Griffiths R. I., Bailey M. J., RNA Stable Isotope Probing, a Novel Means of Linking Microbial Community Function to Phylogeny. (2002) *Appl Environ Microbiol* **68**:5367-5373.
- Manefield, M., Griffiths R., McNamara N. P., Sleep D., Ostle N., Whiteley A. (2007) Insights into the fate of a ¹³C labelled phenol pulse for stable isotope probing (SIP) experiments. *J Microbiol Methods* **69**:340-344.
- Manz, W., M. Eisenbrecher, et al. (1998) Abundance and spatial organization of Gram-negative sulfatereducing bacteria in activated sludge investigated by *in situ* probing with specific 16S rRNA targeted oligonucleotides. *FEMS Microbiol Ecol* **25**: 43-61.
- McDougall, R., Robson, J. et al. (1997) Bacteremia caused by a recently described novel *Desulfovibrio* species. *J Clin Microbiol* **35**(7): 1805-1808.
- Miroschnichenko, M.L., Kostrikina N.A., Chernyh N.A., Pimenov N. V., Tourova T. P., Antipov A. N., Spring S., Stackebrandt E., Bonch-Osmolovskaya E. A. (2003) *Caldithrix abyssi* gen. nov., sp. nov., a nitrate-reducing, thermophilic anaerobic bacterium isolated from a Mid-Atlantic Ridge hydrothermal vent, represents a novel bacterial lineage. *Int J Syst Evol Microbiol* **53**: 323-329.
- Mori, K., Kim, H., Kakegawa, T. and Hanada, S. (2003) A novel lineage of sulfate-reducing microorganisms: Thermodesulfobiaceae fam. nov., Thermodesulfobium narugense, gen. nov., sp. nov., a new ther-mophilic isolate from a hot spring. *Extremophiles* **7**: 283-290.
- Muyzer, G., Teske, A., Wirsén, C.O. and Jannasch, H.W. (1995) Phylogenetic relationships of Thiomicrospira species and their identification in deep-sea hydrothermal vent samples by denaturing gradient gel electrophoresis of 16S rDNA fragments. *Arch Microbiol* **164**, 165-172.

- Muyzer, G. & Stams A. J. M. (2008) The ecology and biotechnology of sulphate-reducing bacteria. *Nature Review* **6**: 441-454.
- Nakagawa, T., S. Hanada, et al. (2002) Distribution and diversity of thermophilic sulfate-reducing bacteria within a Cu-Pb-Zn mine (Toyoha, Japan). *FEMS Microbiol. Ecol.* **41**: 199-209.
- Nedwell, D. B., Walker, T.T., Ellis-Evans, J.C., Clarke, A. (1993) Measurements of seasonal rates and annual budgets of organic carbon fluxes in an Antarctic coastal environment at Signy Island, South Orkney Islands, suggest a broad balance between production and decomposition. *Appl Environ Microbiol* **59**, 3989-3995.
- Neidhart, F.C., Umbarger, H.E. (1996) Chemical composition of *Escherichia coli*. Neidhart, F.C. (Ed.), *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*: Cellular and Molecular Biology. ASM Press, Washington, DC, pp. 13–16.
- Neufeld J.D., Vohra J., Dumont M.G., Lüders T., Manefield M., Friedrich M.W. et al. (2007) DNA stable-isotope probing. *Nat Protoc* **2**: 860-866.
- Pandey, J., Ganesan, K., Jain R. K. (2007) Variations in T-RFLP profiles with differing chemistries of fluorescent dyes used for labelling the PCR primers. *J Microbiol Methods* **68**:633-638.
- Parkes, R. J., Gibson G. R., Mueller-Harvey I., Buckingham W. J., Herbert R. A. (1989) Determination of the substrates for sulphate-reducing bacteria within marine and estuarine sediments with different rates of sulphate reduction. *J Gen Microbiol* **135**: 175-187.
- Pe´rez-Jime´nez, J. R., and L. J. Kerkhof (2005) Phylogeography of sulfatereducing bacteria among disturbed sediments, disclosed by analysis of dissimilatory sulfite reductase genes (*dsrAB*). *Appl Environ Microbiol* **71**: 1004–1011.
- Peterson B. J., Fry B. (1987) Stable Isotopes in Ecosystem studies. *Ann Rev Ecol Syst* **18**: 293-320.
- Phelps, C. D., L. J. Kerkhof, et al. (1998). Molecular characterization of a sulfate-reducing consortium which mineralizes benzene. *FEMS Microbiology Ecology* **27**: 269-279.
- Quaiser, A., Lopez-Garcia P., Zivanovic Y., Henn M. R., Rodriguez-Valera F., Moreira D. (2008) Comparative analysis of genome fragments of *Acidobacteria* from deep Mediterranean plankton. *Environ Microbiol* **10**:2704-2717.
- Qiu X.Y., Wu L.Y., Huang H.S., McDonel P.E., Palumbo A.V., Tiedje J.M., Zhou J.Z. (2001) Evaluation of PCR-generated chimeras: mutations, and heteroduplexes with 16S rRNA gene-based cloning. *Appl Environ Microbiol* **67**: 880-887.
- Osborn, A. M., Moore E. R. B., Timmis K. N, (2000) An evaluation of terminal-restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) analysis for the study of microbial community structure and dynamics. *Evniron Microbiol* **2**:39-50.
- Oude Elferink, S. J. W. H., Visser, A., Hulshoff-Pol, L. W. & Stams, A. J. M. (1994) Sulphate reduction in methanogenic bioreactors. *FEMS Microbiol Rev* **15**:119–136.
- Ouattara, A.S., Patel, B.K., Cayol, J.L., Cuzin, N., Traore, A.S. and Garcia, J.L. (1999) Isolation and characterization of *Desulfovibrio burkinensis* sp. nov. from an African ricefield, and phylogeny of *Desulfovibrio* alcoholivorans. *Int J Syst Bacteriol* **49 Pt 2**, 639-643.
- Rabus, R., T. Hansen, and F. Widdel. (2000) Dissimilatory sulfate- and sulfurreducing prokaryotes. In M. Dworkin, S. Falkow, E. Rosenberg, K.-H. Schleifer, and E. Stackebrandt (ed.), *The*

prokaryotes: an evolving electronic resource for the microbiological community, 3rd ed. Springer-Verlag, New York, N.Y.

- Radajewski, S., Ineson P., Parekh N. R., Murrell J. C. (2000) Stable-isotope probing as a tool in microbial ecology. *Nature* **403**: 646-649.
- Rao, T.S., Sairam, T.N. et al. (2000) Carbon steel corrosion by iron oxidising and sulphate reducing bacteria in a freshwater cooling system. *Corrosion Science* **42**(8): 1417-1431.
- Rappé, M.S., Kemp P.F., Giovannoni S.J. (1997) Phylogenetic diversity of marine coastal picoplankton 16S rRNA genes cloned from the continental shelf off Cape Hatteras, North Carolina. *Limnol Oceanogr* **42**: 811-826.
- Ravenschlag, K., Sahm, K., Pernthaler, J., Amann, R. (1999) High bacterial diversity in permanently cold marine sediments. *Appl Environ Microbiol* **65**:3982-3989.
- Ravenschlag, K., Sahm K., Amann R. (2001) Quantitative Molecular Analysis of the Microbial Community in Marine Arctic Sediments (Svalbard). *Appl Environ Microbiol* **67**: 387-395
- Roden, E. E. & Wetzel R. G. (2003) Competition between Fe(III)-reducing and methanogenic bacteria for azetate in iron-rich freshwater sediments. *Microb Ecol* **45**:252-258.
- Rodriguez, J.L.M., Duffy M. A., Tessier A. J., Ebert D., Mouton L., Schmidt T. M. (2008) Phylogenetic characterization and prevalence of “*Spirobacillus cienkowski*”, a red-pigmented, spiral-shaped bacterial pathogen of freshwater *Daphnia* species. *Appl Environ Microbiol* **74**:1575-1582.
- Sagemann, J., Jørgensen B. B., Grell, O. (1998) Temperature dependence and rates of sulfate reduction in cold sediments of Svalbard. *Arctic Ocean. Geomicrobiol J.* **15**:85-100.
- Sahm, K., Knoblauch C., Amann R. (1999) Phylogenetic Affiliation and Quantification of Psychrophilic Sulfate-Reducing Isolates in Marine Arctic Sediments. *Appl Environ Microbiol* **65**:3976-3981.
- Sass, H., Overmann, J., Rutters, H., Babenzien, H.D. and Cypionka, H. (2004) Desulfosporomusa polytropa gen. nov., sp. nov., a novel sulfate-reducing bacterium from sediments of an oligotrophic lake. *Arch Microbiol* **182**, 204-211.
- Schauder, R., Eikmanns, B., Thauer, T. K., Widdel, F. & Fuchs, G. (1986) Azetate oxidation to CO₂ in anaerobic bacteria via a novel pathway not involving reactions of the citric acid cycle. *Arch Microbiol* **145**, 162–172.
- Scheid, D. and Stubner, S. (2001) Structure and diversity of Gram-negative sulfate-reducing bacteria on rice roots. *FEMS Microbiol Ecol* **36**, 175-183.
- Schmalenberger, A., Drake H. L., Kusel K. (2007) High unique diversity of sulphate-reducing prokaryotes characterized in a depth gradient in an acidic fen. *Environ Microbiol* **9**(5): 3976-3981
- Schönborn, L., Abdollahi, H. et al. (2001) A member of the delta subgroup of *Proteobacteria* from a pyogenic liver abscess is a typical sulfate reducer of the genus *Desulfovibrio*. *J Clin Microbiol* **39**(2): 787-790.

- Schramm, A., C. M. Santegoeds, et al. (1999) On the occurrence of anoxic microniches, denitrification and sulfate reduction in aerated activated sludge. *Appl Environ Microbiol* **65**(9): 4189-4196.
- Sekiguchi, Y., Muramatsu, M., Imachi, H., Narihiro, T., Ohashi, A., Harada, H., Hanada, S. and Kamagata, Y. (2008) *Thermodesulfovibrio aggregans* sp. nov. and *Thermodesulfovibrio thiophilus* sp. nov., anaerobic, thermophilic, sulfate-reducing bacteria isolated from thermophilic methanogenic sludge, and emended description of the genus *Thermodesulfovibrio*. *Int J Syst Evol Microbiol* **58**: 2541-2548.
- Sipos R., Szekely A., Palatinsky M., Revesz S., Mariageti K., Nikolausz M. (2007) Effect of primer mismatch, annealing temperature and PCR cycle number on 16S rRNA gene-targeting bacterial community analysis. *FEMS Microbiol Ecol* **60**: 341-350.
- Sørensen J., Christensen D., Jørgensen B.B. (1981) Volatile Fatty Acids and Hydrogen as Substrate for Sulfate Reducing Bacteria in Anaerobic Marine Sediments. *Appl Environ Microbiol* **42**: 5-11.
- Stackebrandt, E., Sproer, C., Rainey, F.A., Burghardt, J., Pauker, O. and Hippe, H. (1997) Phylogenetic analysis of the genus *Desulfotomaculum*: evidence for the misclassification of *Desulfotomaculum gut-toideum* and description of *Desulfotomaculum orientis* as *Desulfosporosinus orientis* gen. nov., comb. nov. *Int J Syst Bacteriol* **47**: 1134-1139.
- Stahl, D. A., A. Loy, and M. Wagner (2007) Molecular strategies for studies of natural populations of sulphate-reducing microorganisms, p. 39–117. In L. L. Barton and W. A. Hamilton (ed.), *Sulfate-reducing bacteria: environmental and engineered systems*. Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom
- Stams, A. J. M., Hansen T. A., Skyring G. W. (1985) Utilization of amino acids as energy substrates by two marine *Desulfovibrio* strains. *FEMS Microbiol Ecol* **31**: 11-15.
- Stams, A. J. M., Oude Elferink, S. J. W. H. & Westermann, P. (2003) Metabolic interactions between methanogenic consortia and anaerobic respiring bacteria. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* **81**: 31–56.
- Sung, Y., K. M. Ritalahti, et al. (2003) Characterization of two tetrachloroethene-reducing, azetateoxidizing anaerobic bacteria and their description as *Desulfuromonas michiganensis* sp. nov. *Appl Environ Microbiol* **9**(5): 2964-74.
- Suzuki, M. T., Giovannoni S. J. (1996) Bias caused by template annealing in the amplification of mixtures of 16S rRNA genes by PCR. *Appl Environ Microbiol* **62**: 625-630.
- Teske, A., Durbin, A., Ziervogel, K., Cox, C., Arnosti, C. (2011) Microbial Community Composition and Function in Permanently Cold Seawater and Sediments from an Arctic Fjord of Svalbard. *Appl Environ Microbiol* **77**:2008-2018.
- Thamdrup, B. (2000) Bacterial manganese and iron reduction in aquatic sediments. pp. 41-84. Kluwer Academic/Plenum Publ, New York.
- Thauer, R. K., Jungermann, K. Decker, K. (1977) Energy conservation in chemotrophic anaerobic bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev* **41**: 100-180.

- Thauer, R. K., Stackebrandt, E. & Hamilton, W. A. (2007) *Sulphate-Reducing Bacteria: Environmental and Engineered Systems* (eds Barton, L. L. & Hamilton, W. A.) 1–37 Cambridge Univ. Press
- Vandieken, V., Nickel M., Jørgensen B. B. (2006) Carbon mineralization in Arctic sediments northeast of Svalbard: Mn(IV) and Fe(III) reduction as principal anaerobic respiratory pathways. *Mar Ecol Prog Ser* **322**: 15-27.
- Videla, H. A. (2000) An overview of mechanisms by which sulphate-reducing bacteria influence corrosion of steel in marine environments. *Biofouling* **15**(1-3): 37-47.
- Wagner, M., Horn M. (2006) The Planctomycetes, Verrucomicrobia, Chlamydiae and sister phyla comprise a superphylum with biotechnological and medical relevance. *Curr Opin Biotechnol* **17**:241-249.
- Wagner, M., Loy, A., Klein, M., Lee, N., Ramsing, N.B., Stahl, D.A. and Friedrich, M.W. (2005) Functional marker genes for identification of sulfate-reducing prokaryotes. In *Environmental Microbiology*. pp.469-489. San Diego: Elsevier Academic Press Inc.
- Wagner, M., Roger, A.J., Flax, J.L., Brusseau, G.A. and Stahl, D.A. (1998) Phylogeny of dissimilatory sulfite reductases supports an early origin of sulfate respiration. *J Bacteriol* **180**: 2975-2982.
- Watson, S.W., Bock E., Valois F. W., Waterbury J. B., Schlosser U. (1986) *Nitrospira marina* gen. nov., sp. nov.: a chemolithoautotrophic nitrite-oxidizing bacterium. *Arch Microbiol* **144**:1-7.
- Weber, S., Stubner, S. and Conrad, R. (2001) Bacterial populations colonizing and degrading rice straw in anoxic paddy soil. *Appl Environ Microbiol* **67**, 1318-1327.
- Wentrup, C. (2007) Potential identity and abundance of novel and uncultured sulphate-reducing microorganisms in an acidic fen system. In *Department of Microbial Ecology at the University of Vienna*. p.122. Göttingen: University of Göttingen.
- Wessel, P. and W. H. F. Smith (1998) New, improved version of generic mapping tools released. *Eos Trans AGU* **79**(47):579
- Whiteley, A. S., Thomson B., Lueders T., Manefield M. (2007) RNA stable-isotope probing. *Prot Nat* **2**:838-843.
- Whitmire, S.L. and Hamilton, S.K. (2005) Rapid removal of nitrate and sulfate in freshwater wetland sediments. *J Environ Qual* **34**: 2062-2071.
- Widdel, F. (1988) Microbiology and ecology of sulfate- and sulfur-reducing bacteria. *Biology of anaero-bic microorganisms A J B Zehnder New York, John Wiley & Sons*, 469-585.
- Wollast, R. (1991) The coastal organic carbon cycle: fluxes, sources, and sinks In R.F.C. Mantoura, J.-M. Martin & R. Wollast (cd.), *Ocean margin processes in global change*. John Wiley & Sons, New York, N.Y. p.365-381.

7. Abkürzungen

'	Minute
"	Sekunde
°C	Grad Celsius
μ	mikro (10^{-6})
Abb.	Abbildung
abs.	absolut
b	Base(n)
bidest.	bidestilliert
bp	Basenpaar(e)
bzw.	beziehungsweise
C	Kohlenstoff
ca.	circa
CaCl ₂	Kalziumchlorid
CaSO ₄	Kalziumsulfat, Gips
cDNA	„complementary DNA“, komplementäre DNA
CHISAM	Chloroform/Isoamylalkohol
cm	Zentimeter
d	Tag
dNTP	Deoxynukleosid-Triphosphat
dest.	destilliert
DNA	„Deoxyribonucleic acid“, Desoxyribonukleinsäure
ds	doppelsträngig
EDTA	Ethylen-Diamin-Tetraazetat
ERG	Eppendorf-Reaktionsgefäß
et al.	et alii (lat. „und andere“)
etc.	et cetera (lat. „und weitere“)
EtBr	Ethidium Bromid
EtOH	Ethanol
FISH	Fluoreszenz in situ Hybridisierung
g	Gramm
h	Stunde(n)
H	Wasserstoff
H ₂ O	Wasser
H ₂ S	Schwefelwasserstoff
k	Kilo (1000)
kb	Kilobasen
KbL	„Kilobasen-Leiter“, DNA Längenstandard
m	milli (10^{-3}), Meter
M	molar
mol	Mol
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
min	Minute(n)
Mrd.	Milliarde(n)

n	nano (10^{-9})
N	Normal
NaCl ₂	Natriumchlorid
PBS	„Phosphate buffered saline“ Phosphat-gepufferte Saline-Lösung
PCI	Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol
PCR	„Polymerase Chain Reaktion“, Polymerase Kettenreaktion
RNA	„Ribonucleic acid“, Ribonukleinsäure
rpm	„revolutions per minute“, Umdrehungen pro Minute
rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
S ₀	elementarer Schwefel
S ²⁻	Sulfid
SDS	„Sodium dodecyl sulfate“ Natrium-Dodecylsulfat
sec	Sekunde(n)
SO ₃ ²⁻	Sulfit
SO ₄ ²⁻	Sulfat
S ₂ O ₃ ²⁻	Thiosulfat
S ₄ O ₆ ²⁻	Tetrathionat
SOB	schwefeloxidierende Bakterien
sp.	Art
spp.	Arten
ss	„single stranded“, einzelsträngig
SRM	Sulfatreduzierende Mikroorganismen
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Azetat-EDTA
Taq	thermostabile DNS-abhängige DNS-Polymerase aus <i>Thermus aquaticus</i>
TBE	Tris-Borsäure-EDTA
TE	Tris-EDTA
TMAC	Tetramethyl-Ammoniumchlorid
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Units (Enzymeinheit)
ü.N.	über Nacht
V	Volt
v/v	Volumen/Volumen
x	mal

8. Anhang

Standardkurve

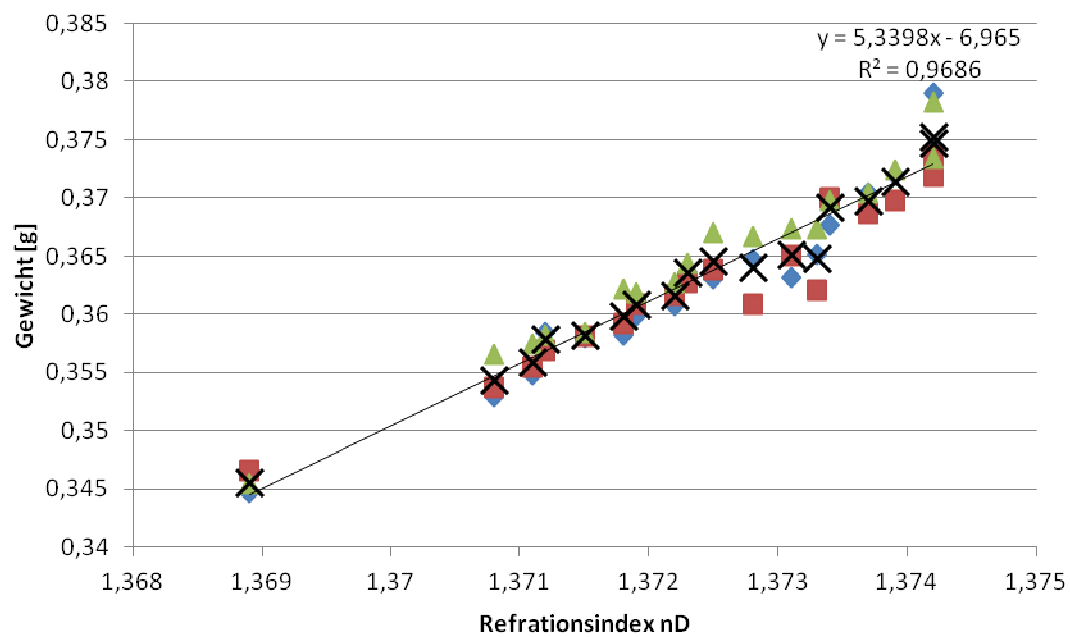


Abb.A1: Kalibrierungskurve des CsTFA Dichtegradienten mit drei Replikaten (Dreiecke und Vierecke) und den berechneten Mittelwerten (X)

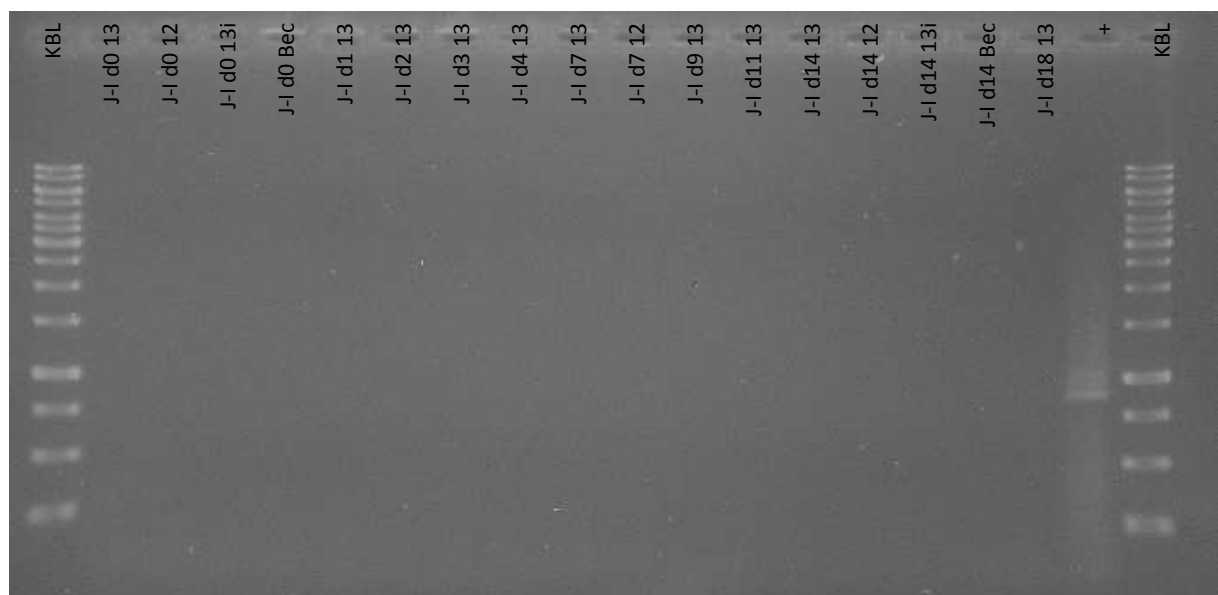


Abb.A2: PCR Produkte der RNA mit breiten bakteriellen Primern 616V und 907R um Spuren von DNA in RNA Isolaten nachzuweisen.

Tab.A1: Sulfatreduktionsraten der Inkubationen der Proben aus Station J. Aus jeweils drei Replikaten wurden der Mittelwert und die Standardabweichung berechnet.

	Probe	Dauer der Inkubation (Tage)	SSR Mittelwert (nmol cm ⁻³ d ⁻¹)	SSR Standardabweichung (nmol cm ⁻³ d ⁻¹)
Station J	12	0	16,26	10,16
Station J	12	1	10,77	6,56
Station J	12	2	20,12	17,96
Station J	12	3	10,55	4,54
Station J	12	4	13,60	5,71
Station J	12	7	15,63	6,35
Station J	12	9	15,93	4,77
Station J	12	11	22,72	8,74
Station J	12	14	23,18	4,29
Station J	12	16	22,17	3,09
Station J	12	18	20,55	0,92
Station J	12	21	17,80	2,06
Station J	13	0	14,26	1,72
Station J	13	1	17,48	5,26
Station J	13	2	19,09	5,90
Station J	13	3	17,97	5,15
Station J	13	4	19,80	5,41
Station J	13	7	20,31	5,80
Station J	13	9	18,20	3,82
Station J	13	11	21,49	8,45
Station J	13	14	22,47	7,57
Station J	13	16	19,15	5,42
Station J	13	18	21,13	2,78
Station J	13	21	18,12	1,28
Station J	13i	0	0,44	0,27
Station J	13i	1	0,10	0,14
Station J	13i	2	0,15	0,02
Station J	13i	3	0,08	0,10
Station J	13i	4	0,02	0,02
Station J	13i	7	0,20	0,19
Station J	13i	9	0,07	0,10
Station J	13i	11	0,81	1,27
Station J	13i	14	0,19	0,29
Station J	13i	16	0,51	0,78
Station J	13i	18	1,21	1,97
Station J	13i	21	0,11	0,22
Station J	B	0	9,51	1,92
Station J	B	1	7,39	0,38
Station J	B	2	8,67	6,48
Station J	B	3	9,90	0,05
Station J	B	4	13,42	5,43
Station J	B	7	11,42	3,63
Station J	B	9	10,13	2,73
Station J	B	11	12,40	1,59
Station J	B	14	9,89	1,40
Station J	B	16	12,92	3,91
Station J	B	18	15,10	1,76

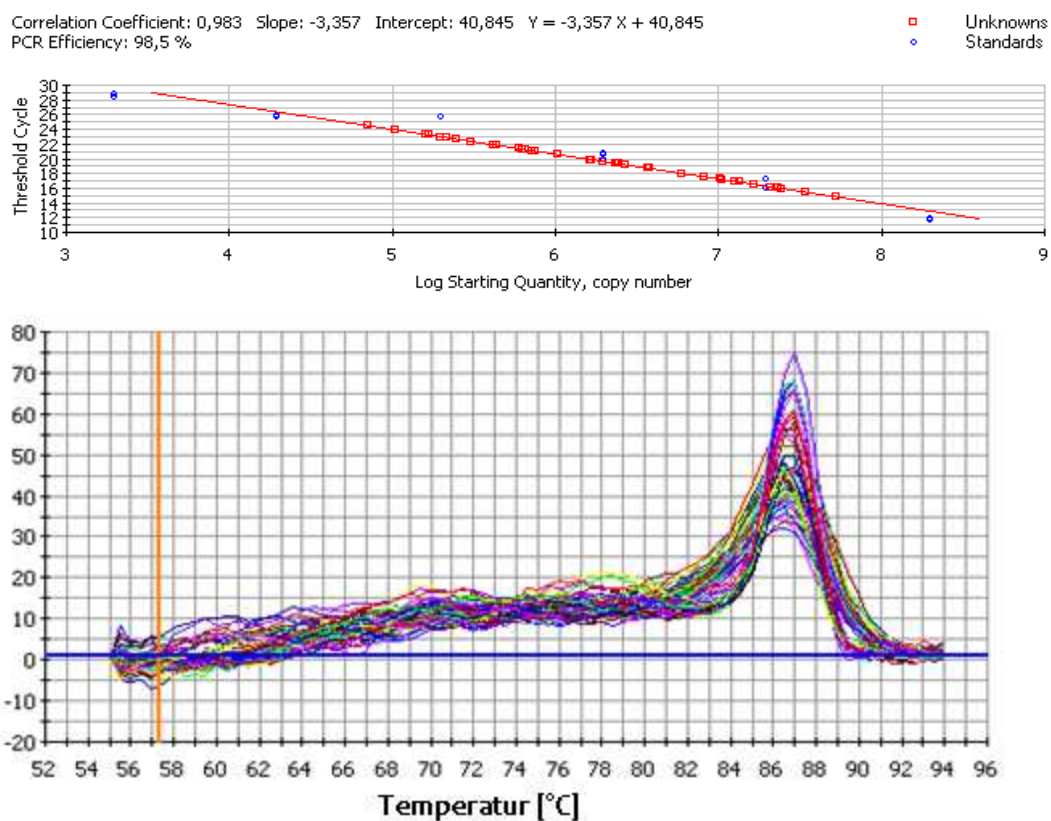


Abb.A3: Standardkurve einer q-PCR der Probe AH-1 Tag0. Die Umweltproben liegen zentriert innerhalb der Standards. Die Schmelzkurvenanalyse der gleichen Probe weist keine Primer-Dimere auf.

Tab.A2: Fläche unter der Kurve der drei, bereits in Fraktionen hoher Dichte vorkommenden Peaks.

Dichte	Peak 45	Peak 63	Peak 486
1,857	247,8	88	27,3
1,854	190,2	2406	140
1,846	164,6	1738	134,6
1,841	217,9	476	146
1,833	31,8	1513	73,5
1,827	61,4	2118	55
1,819	94,9	2152	98
1,817	59	1064	34,3
1,803	2	10581	23,5
1,795	1	10783	22,5
1,793	3	5863	2,2
1,787	4	1921	1,8
1,782	2	1547	
1,774	31	1235	
1,771	40	3104	
1,761	33	4259	
1,753		5199	
1,678		2722	
1,189	8	10014	

9. Curriculum Vitae

Persönliche Daten

Name	Martina Putz
Geburtsdatum	8. Juli 1987
Geburtsort	Vorau
Staatsbürgerschaft	Österreich

Schul- und Berufsbildung

1993-1997	Volksschule Rohrbach an der Lafnitz
1997-2001	Hauptschule Rohrbach an der Lafnitz
2002-2005	BORG Hartberg mit Abschluss AHS-Matura
2005-2012	Studium der Biologie – Universität Wien Fachrichtung: mikrobielle Ökologie
2010-2012	Diplomarbeit am Department für Mikrobielle Ökologie, Universität Wien

10. Danksagung

An dieser Stelle besonders danken möchte ich mich:



Albert Müller meinem Betreuer, der mir während meine Diplomarbeit entstanden ist, immer sehr bemüht zu Seite stand und mit mir einen Schreibtisch teilte.



Alexander Loy, für die Möglichkeit meine Diplomarbeit an diesem Department erstellen zu dürfen.



Celine Lesaulnier, for her indispensable helping hands.



allen Mitgliedern des Departments, speziell der Arbeitsgruppe unter Alexander Loy, in der man mit jedem Problem mit offenen Armen und einem Lächeln empfangen wird.



Julia Rosa de Rezende für das mühevollen inkubieren äquivalenter Proben und die erfolgreichen Messungen der Sulfatreduktionsraten.



Christian Baranyi und Martina Grill für das rasche Erledigen sämtlicher T-RFLP Analysen.



Margarete Watzka vom Department für chemische Ökologie und Ökosystemforschung für die Auswertung der IRMS Proben.



Meiner Familie für die Rundum-Unterstützung während meiner Studienzeit, Roman und vor allem Ina, Anna, Chrisi und Jules sowie meinen Mitbewohnern Sandra, Christoph und Johannes mit denen der Weg durchs Studium sehr Spaßig war.